OPTIMIERUNG EINER MIKROBIELLEN DEHYDROGENIERUNG VON HYDROCORTISON ZU PREDNISOLON

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Manfred Rippe
aus Bremen

Göttingen 1973

OPTIMIERUNG EINER MIKROBIELLEN DEHYDROGENIERUNG VON HYDROCORTISON ZU PREDNISOLON

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Manfred Rippe
aus Bremen

Göttingen 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H.G. Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 12 Juli 73

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäuren
C_E	Gleichgewichtskonzentration des in der Flüssigkeit gelösten Sauerstoffs mit dem Partialdruck der Gasphase (mmole O_2/l)
CH	Caseinhydrolysat
C_L	Konzentration des in der Flüssigkeit gelösten Sauerstoffs (mmole O_2/l)
$\frac{dC_L}{dt}$	Geschwindigkeit der Sauerstoffkonzentrationsänderung in der Flüssigkeit (mmole O_2/l · h)
E_E	Ertrag als Extinktion$_{550}$ · 10^1
E_P	Ertrag als Protein (mg/ml)
E_{TG}	Ertrag als Trockengewicht (g/l)
F	Hydrocortison
FAD	Flavinadenindinucleotid
FP	Fleischextrakt/Pepton-Medium
TK	Trockenkultur
g	Generationszeit (h)
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
$K_L a$	Volumetrischer O_2-Absorptionskoeffizient (h^{-1})
K_m	Michaelis-Menten Konstante (% CH)
MAF	Hydrocortison-17-Acetat
MibK	Methylisobutylketon
μ	Wachstumsrate (h^{-1})
μ_{max}	maximale Wachstumsrate (h^{-1})
$NADP^+$	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat

$NADPH + H^+$	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
γ	Teilungsrate (h^{-1})
OAR	Sauerstoffabsorptionsrate (mmole O_2/l · h)
Pln	Prednisolon
Qx	Volumetrische O_2-Konsumptionsrate der Zellen (mmole O_2/l · h)
S	Konzentration von CH
SMM	synthetisches Minimalmedium
t_d	Verdopplungszeit (h)
TG	Trockengewicht (g/l)

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG 1

METHODEN 3

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

A. Bestimmung des Stammes nach bakteriologischen Identifizierungsmethoden 25

B. Ermittlung von Nährstoffbedürfnissen durch Versuche mit synthetischen Medien 29

I. Bestimmung der Wachstumsparameter in synthetischem Minimalmedium 29

II. Einfluß einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle 34

1. Submersversuche 34

2. Manometrische Versuche 36

III. Einfluß einer zusätzlichen Stickstoffquelle 39

1. Harnstoff und Ammoniumchlorid in Verbindung mit einem 16-Aminosäure-Medium 39

2. Wirkung von Harnstoff in Verbindung mit Caseinhydrolysat 40

IV. Einfluß von Vitaminen 40

V. Steroidumwandlung in synthetischem Medium 41

C. Versuche in Vollmedium 42

I. Wachstumsparameter des Grundmediums 42

II. Erhöhung des Ertrages durch Änderung der Nährstoffzusammensetzung 43

III. Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf der Kultur 44

1. Bestimmung des Sauerstoffübergangskoeffizienten nach der Sulfitmethode 45

2. Messung des in Flüssigkeit gelösten Sauerstoffs 48

2. 1 Polarographische Sauerstoffmessung in Fermentationsmedien 48

Seite

2.2 Erstellung von Eichkurven für einige Fermentationsmedien 50

3. Einfluß von Antischaummittelzusätzen auf die Menge des gelösten Sauerstoffs 52

4. Anzucht der Kultur 54

5. Ermittlung des für die Anzucht kritischen Sauerstoffangebotes 56

6. Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur 58

7. Sauerstoffbedarf der Kultur in stationärer Phase 59

7.1 Manometrische Messung des Sauerstoffverbrauchs 59

7.2 Messung des Sauerstoffverbrauchs der Submerskultur 63

7.3 Bestimmung von $K_L a$ im geplanten Versuchszeitraum nach der dynamischen Methode 65

D. Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon 67

I. Einführende Darstellung 67

1. Geschichtlicher Überblick über die mikrobielle Δ^1-Dehydrogenierung von Steroiden 67

2. Modellversuch einer Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon 69

II. Optimierung von Δ^1-Dehydrogenierungsparametern bei der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon mit dem Testorganismus 72

1. Optimierung des Zeitpunktes der Substratzugabe 72

2. Bestimmung des für die Δ^1-Dehydrogenierung optimalen pH-Bereichs 74

3. Bestimmung des für die Δ^1-Dehydrogenierung optimalen Temperaturbereiches 76

4. Bestimmung des für die Δ^1-Dehydrogenierung kritischen Sauerstoffpartialdrucks 77

5. Versuche zur Steigerung der Δ^1-Dehydrogenierungsaktivität 80

Seite

6. Versuche zur Steigerung der Einsatzmenge von Hydrocortison 81

III. Verwertung der Optimierungsergebnisse unter praxisgerechten Voraussetzungen 83

1. Versuchsbedingungen 83

2. Umwandlung eines Gemisches von Hydrocortison und Hydrocortison-17-Acetat zu Prednisolon 83

DISKUSSION 86

ZUSAMMENFASSUNG 93

LITERATURVERZEICHNIS 98

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534919_0005

EINLEITUNG

In den letzten dreißig Jahren wurden zahlreiche Mikroorganismen gefunden, die in der Lage sind, Steroide umzuwandeln. Ausführliche Übersichtsarbeiten mit der Beschreibung der zahlreichen Reaktionstypen und der untersuchten Mikroorganismen wurden von CAPEK et al. (1966), CHARNEY und HERZOG (1967) sowie IIZUKA und NAITO (1967) veröffentlicht.

Die Funktion der an der Umwandlung beteiligten Enzyme im Organismenstoffwechsel ist nicht bekannt; solche Fähigkeiten sind für den Organismus selbst anscheinend nicht von besonderem Nutzen, sondern eher gleichgültig. Ähnliche Phänomene sind auch aus dem Bereich der höheren Pflanzen gut bekannt. FRITSCHE (1967) spricht in diesem Zusammenhang davon, daß "unter den Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen Potenzen vorkommen, die ohne Funktion sind". METZ (1967) formuliert allgemein, daß "bei manchen mikrobiologischen Stoffumwandlungen auch Stoffe umgesetzt werden, die der Organismus selbst nicht benötigt oder die für ihn stoffwechselfremd sind". Andere, wie z.B. CAPEK (1957), vermuten einen Entgiftungseffekt, da manche Steroide Atmungsgifte darstellen, ihre Metabolite dagegen nicht.

Erste Experimente zur mikrobiellen Fermentierung von Steroiden wurden bereits 1937 von MAMOLI und VERCELLONE beschrieben. Mit Hefe wiesen sie eine Reduktion von 17-Ketosteroid zu 17ß-Hydroxysteroid (Testosteron) nach, dessen Struktur 1935 von BUTENANDT und RUZICKA aufgeklärt worden war. Wenig später berichteten MAMOLI (1939) und MAMOLI et al. (1939) über mikrobielle Dehydrogenierungen mit Corynebacterium mediolanum. Ergebnisse zur 7-Dehydrogenierung mit Azotobacter sp. sowie 7-Hydroxylierung von Cholesterin mit Proactinomyces sp. wurden in den Jahren 1947 und 1948 von HORVATH und KRAMLI veröffentlicht. 1949 entdeckten dann HENCH et al. die Heilwirkung der Nebennierenrindenhormone - speziell des Cortison-21-

Acetates - auf rheumatische Erkrankungen. Für diesen Beitrag und für die Erforschung des chemischen Baues erhielten HENCH, KENDALL und REICHSTEIN 1950 den Nobelpreis. Unter dem Gesichtspunkt dieser therapeutischen Wirksamkeit war die Entdeckung der 11α-Hydroxylierung von Progesteron mit Rhizopus sp. durch PETERSON und MURRAY (1952) von großer Bedeutung, desgleichen die 11ß-Hydroxylierung von Reichsteins Verbindung S zu Hydrocortison mit Streptomyces fradiae durch COLINGSWORTH et al. (1952).

Im Zusammenhang mit der Erforschung dieser Hydroxylasen wurden auch zahlreiche andere Aktivitäten bei vielen Mikroorganismen festgestellt. Erste Berichte über Δ^1-Dehydrogenierungen wurden von FRIED (1953) veröffentlicht; von weiteren Beobachtungen dieser Art berichteten VISCHER und WETTSTEIN (1953); mit Corynebacterium simplex gelangen NOBILE et al. (1955) sowie HERZOG et al. (1962) weitere Δ^1-Dehydrogenierungen mit verschiedenen Substraten. Von den letztgenannten wurden erstmals aus Cortison und Hydrocortison die 1-dehydrogenierten Substanzen mikrobiologisch hergestellt, die man später Prednison und Prednisolon nannte, zwei von denen TOLKSDORF et al. (1956) in Tierversuchen ermittelten, daß ihre therapeutische Wirksamkeit drei- bis fünfmal so hoch war wie die der Ausgangsstoffe.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit liegt in der Optimierung von Parametern der Zellvermehrung und der Steroidumwandlung bei der Δ^1-Dehydrogenierung von Hydrocortison zu Prednisolon.

Einleitend wird der Versuchsorganismus in das derzeit allgemein anerkannte System nach BERGEY'S MANUAL (1957) eingeordnet. Die folgenden beiden Abschnitte beschäftigen sich mit der Vermehrung des Organismus, der eine stellt die Nährstoffbedürfnisse aus der Sicht definierter synthetischer Medien dar; auf dieser Basis schließen sich Untersuchungen bei Verwendung von Vollmedien verschiedener Zusammensetzung an. Im vierten Abschnitt schließlich werden Parameter untersucht, welche die Hydrocortison-Δ^1-Dehydrogenierung beeinflussen.

METHODEN

1. Organismen

Als Ausgangskultur für die vorliegenden Untersuchungen diente eine getrocknete Bacillus-Kultur mit der Bezeichnung TK 132 B. Um ausreichend gleichmäßiges Material für die Versuche zur Verfügung zu haben, wurden hiervon drei weitere Trockenchargen angelegt.

Zu Vergleichszwecken stand ein von der AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION gekaufter Stamm Bacillus sphaericus (ATCC 7055) zur Verfügung.

2. Nährlösungen und Kulturverfahren

Die Sterilisation der benutzten Nährmedien erfolgte - wenn nicht gesondert vermerkt - 30 Minuten bei 121° C, die Bebrütungstemperatur lag bei 30° C. Die Anzucht aus dem Trockenröhrchen geschah stets in FP-Medium:

Fleischextrakt	0,3 g
Pepton	0,5 g
dest. Wasser	100 ml
pH 7,0	

2. 1 Nährmedien zur systematischen Bestimmung des Organismus (SMITH et al., 1952; KUNDRAT, 1963; CLAUS, 1965)

Sporenbildung (GIBSON, 1935)

Fleischextrakt	0,5 g
Pepton	0,5 g
NH_4Cl	0,5 g
Agar	2,0 g
dest. Wasser	100 ml

Keim- und Sporenfärbung (BARTHOLOMEW und MITTWER, 1950)

Der flammenfixierte Ausstrich wurde mit einer filtrierten, wässrigen 5 %igen Malachitgrünlösung bedeckt und leicht erwärmt (5 Minuten). Nach Abspülen mit Leitungswasser wurde mit einer 0,5 %igen wässrigen Safraninlösung 5 Minuten gegengefärbt. Anschließend wurde nochmals abgespült und mit Filterpapier getrocknet. Jetzt erschienen die Sporen grün und die übrige Zelle rot gefärbt.

Hydrolyse von Stärke

Fleischextrakt	0,3 g
Pepton	0,5 g
Agar	1,5 g
dest. Wasser	100 ml
pH 7,0	
Kartoffelstärke	1,0 g

Nach Vorbereiten der Petrischalen wurden aus einer Anzucht in FP-Medium Keime entnommen und 4 Platten ausgestrichen. Nach 1 und 2 Tagen erfolgte die Auswertung zweier bebrüteter Platten in folgender Weise:

Platte 1: Nach Überschichten mit 95 %igem Äthylalkohol soll erfolgte Hydrolyse von Stärke durch klare Zonen im sonst trüben Nährboden erkennbar werden.
Platte 2: Mit Lugolscher Lösung überschichtete Platten erscheinen blau; hier kennzeichnen helle Zonen den Stärkeabbau.

Hydrolyse von Casein

10 ml steriler Wasseragar (2,5 %ig) wurde mit 5 ml steriler Magermilch in der Petrischale gemischt. Auf diesen Nährboden wurden Testkeime als Strichkultur zur Ausbildung von Einzelkolonien aufgetragen. Nach zweitägigem Bebrüten sollen aufgehellte Zonen um die Kolonien Proteaseaktivität anzeigen.

Hydrolyse von Gelatine

Nährböden aus FP-Agar mit 0,4 % Gelatine wurden für diesen Test vorbereitet, angeimpft und nach 3 Tagen durch Schrägstellen und teilweises Überfluten mit 8 bis 10 ml folgender Lösung ausgewertet:

$HgCl_2$	1,5 g
$HCl_{konz.}$	2 ml
dest. Wasser	10 ml

Erfolgter Abbau von Gelatine zeigt sich durch das Auftreten klarer Zonen um die Kolonien herum.

Hydrolyse von Lecithin

300 ml FP-Agar wurden verflüssigt, auf 50° C abgekühlt, unter sterilen Bedingungen ein Eidotter hinzugefügt und die hieraus angelegten Platten beimpft. Das Auftreten eines Präzipitats zeigt positive Reaktion an.

Hydrolyse von Harnstoff

Die Kultur wurde auf Röhrchen mit FP-Agar angezogen, nach 2 und 7 Tagen mit Wasser abgeschwemmt, die Suspension in ein sauberes Röhrchen überführt, ein Tropfen Indikator (Phenolrot) hinzugefügt und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die so vorbereitete Suspension wurde in zwei Röhrchen aufgeteilt, eines von beiden enthielt 0,1 g Harnstoff (Kristalle). Bei Vorhandensein von Urease soll in dem Röhrchen mit Harnstoffkristallen das Medium alkalisch werden und der Indikator von gelb nach rot umschlagen.

Voges-Proskauer-Reaktion

Pepton	0,7 g
Glucose	0,5 g
NaCl	0,5 g
dest. Wasser	100 ml

Röhrchen wurden mit je 5 ml dieses Mediums gefüllt, 15 Minuten sterilisiert, beimpft und nach 2, 4 und 6 Tagen ausgewertet. Dabei wurden zu 2 ml Kulturbrühe jeweils 2 ml NaOH (40 %ig) und 0,5 bis 1 mg Creatin gegeben. Bei positiver Reaktion soll nach 30 bis 60 Minuten eine Rotfärbung eintreten.

Reduktion von Nitrat zu Nitrit

Die Anzucht erfolgte in mit je 5 ml FP-Medium + 0,1 % KNO_3 gefüllten Röhrchen. Nach 1, 3, 6 und 8 Tagen wurde jeweils 1 ml steril entnommen, in saubere Röhrchen überführt und einige Tropfen folgender Zusätze zugegeben:
Lösung A: 0,8 g Sulfanilsäure in 100 ml 5 N Essigsäure (1 Teil Eisessig in 2,5 Teilen Wasser).
Lösung B: 0,5 g Dimethyl-α-naphtylamin in 20 ml kochendem dest. Wasser lösen, die farblose Lösung vom Rückstand abgießen, mit 5 N Essigsäure auf 100 ml auffüllen.

Rotfärbung oder gelbes Präzipitat zeigt die Anwesenheit von Nitrit an. Bei negativer Reaktion ist auf Nitrat zu prüfen: Zur Probe wurden einige Tropfen Diphenylamin zugesetzt und mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. Blaufärbung der Grenzschicht zeigt an, daß weiterhin Nitrat vorhanden ist.

Vergärung von Citrat

NaCl	0,1	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,02	g
$(NH_4)_2HPO_4$	0,1	g
KH_2PO_4	0,05	g
Na_3-Citrat	0,2	g
Agar	1,5	g
dest. Wasser	100	ml
pH 7,0		
Phenolrot	2	ml (0,04 %ig)

Rotfärbung zeigt an, daß eine Citratvergärung stattgefunden hat.

Wachstum auf Glucose-Nitrat-Agar

Glucose	0,5	g
KNO_3	0,1	g
Mineralsalzlösung	übliche Zusammensetzung	
Agar	1,5	g
dest. Wasser	100	ml

Nach 2 Tagen wurden die beimpften und bebrüteten Platten auf Wachstum geprüft.

Anaerobes Wachstum in Glucose-Brühe

Tryptose	1 g
K_2HPO_4	0,5 g
Fleischextrakt	0,3 g
Hefeextrakt	0,2 g
Glucose	1 g
dest. Wasser	100 ml
pH 7,6	

Der Test wurde in Gärröhrchen nach Stuyk (MÜLLER und MELCHINGER, 1964) durchgeführt.
Nach 7 Tagen wurden die Röhrchen auf Gasbildung, Wachstum und pH-Änderung kontrolliert.

Säurebildung aus Kohlenhydraten

Basalmedium:	
$(NH_4)_2HPO_4$	0,1 g
KCl	0,02 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,02 g
Hefeextrakt	0,02 g
Agar	0,3 g
dest. Wasser	100 ml

Nach Autoklavieren wurden diesem Medium die zu prüfenden sterilfiltrierten Kohlenhydrate so zugesetzt, daß sie in 0,5 %iger Endkonzentration vorlagen. Es waren: Glucose, Lactose, Maltose, Mannit, Salizin. Als Indikator diente Bromthymolblau.
Die Röhrchen wurden bis zu 14 Tagen täglich kontrolliert. Unbeimpfte, aber bebrütete Röhrchen dienten als Kontrolle. Ein Farbumschlag von blau nach gelb zeigt positive Reaktion an.

Wachstum in NaCl-Brühe

FP-Medium

NaCl	4 - 10 %

Optimum und Maximum der Wachstumstemperatur

FP-Medium

Wachstum bei verschiedenen pH

FP-Medium

pH 6,0 und 7,0

Vitamine als essentielle Wachstumsfaktoren

Zu dem unter Medien beschriebenen synthetischen Minimalmedium wurde das Wachstum mit und ohne Biotin/Thiamin verfolgt.

Bildung von Indol

1 %ige Trypton-Brühe wurde beimpft und nach 6, 10 und 14 Tagen mit 2 ml folgender Lösung geschüttelt:

p-Dimethylaminobenzaldehyd	0,5 g
Amylalkohol	7,5 ml
$HCl_{konz.}$	2,5 ml

Rosa oder rote Farbe der Alkoholschicht zeigt positive Reaktion an.

Entfärbung von Methylenblau

Um Dehydrogenase-Aktivität festzustellen, wurden 50 ml gut angewachsene

Suspension unter Rühren mit Stickstoff begast. Methylenblau (10 ml in der Konzentration 100 mg/Liter Wasser) wurde zugesetzt und auf Entfärbung geachtet.

Aktivität der Steroid-Δ^1-Dehydrogenase

In Suspensionen wurde die Dehydrogenierung von Hydrocortison zu Prednisolon dünnschichtchromatographisch verfolgt. Der Analysengang ist weiter unten beschrieben.

2.2 Fermentationsmedien

Medium 1

Ammoniumbasalsalzmedium

K_2HPO_4	1,5	g
$(NH_4)_2HPO_4$	7,0	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,5	g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,3	g
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	40	mg
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	25	mg
Ammoniummolybdat	2	mg
dest. Wasser	1000	ml

Caseinhydrolysat: 0,025; 0,034; 0,05; 0,1; 0,2 %

Wachstumsfaktoren:

Biotin	0,2 mg
Thiamin	1,0 mg

in 100 ml dest. Wasser gelöst, 2 ml der [illegible] Lösung auf 1000 ml Fermentationsmedium zusetzen.

Medium 2

Fleischextrakt	0,3	g
Pepton	0,5	g
Hefeextrakt	0 bis 5	g
dest. Wasser	100	ml

pH 7,0

Medium 3

Maisquellwasser	0,5	g
Hefeextrakt	0,1 bis 5	g
Leitungswasser	100	ml

pH 7,5

2.3 Herstellung von Trockenkulturen (modifiziert nach OLIVAR, 1967)

Die erste Anzucht erfolgte aus einem Stammröhrchen (TK 132 B) in FP-Medium. Parallel wurden Trockenröhrchen (8 ml) mit je 1,5 ml FP-Agar gefüllt und zum Abkühlen schräg ausgelegt. Danach konnte jedes Röhrchen mit 0,1 ml Anzuchtsuspension beimpft und 2 Tage bei 30° C bebrütet werden. Danach wurden die Röhrchen in einer Gefriertrocknungsanlage im Vakuum ($1 - 2 \times 10^{-2}$ Torr) getrocknet. Nach Ende der Trocknung wurden die Röhrchen mit steriler, trockener Luft belüftet und zugeschmolzen. Der mittlere Gehalt an vermehrungsfähigen Keimen pro Röhrchen lag bei 1×10^{5}. Die so präparierten Kulturen waren über den Berichtszeitraum ohne merklichen Verlust an Aktivität des Wachstums und der Dehydrogenasebildung lagerfähig.

2.4 Fermentationsbedingungen

Wenn nicht anders angegeben, wurde die Anzucht in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml FP-Medium vorgenommen. Sterilisiert wurde 30 Minuten bei 121° C. Das Wachstum vollzog sich auf Rotationsschüttlern (175 U./Min.) bei 30° C, die Laufzeit betrug 24 Stdn. Die Versuche wurden nach Animpfen mit 1 % Anzuchtsuspension in Schüttel- und Belüftungskolben bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Die Bedingungen werden jeweils gesondert angegeben.

2.5 Sterilkontrollen

Die Empfindlichkeit des Testorganismus gegen Fremdkeime - sie behindern im allgemeinen sowohl Wachstum als auch Steroidumwandlung entscheidend - machten ständige Sterilkontrollen nötig. Gramgefärbte Ausstrichpräparate wurden ständig angelegt und mikroskopisch beurteilt. In Einzelfällen, wie bei der Herstellung der Trockenchargen, wurden zusätzlich Anreicherungskontrollen auf FP-Agar bzw. in FP-Medium durchgeführt.

3. Wachstumsmessungen

3.1 Die Trübung der Suspension wurde im Beckman-Spektralphotometer (Modell DB) bei 550 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gegen unbeimpfte Nährlösung bestimmt. Bei Extinktionswerten über 0,5 wurden die Proben mit Nährlösung verdünnt, um die Proportionalität zwischen Meßwert und Zellzahl zu wahren.

3.2 Die Zellzahl wurde in der Zählkammer nach Helber ermittelt. Verdün-

nungen wurden mit Wasseragar (0,5 %) vorgenommen, um die schnelle Bewegung der Stäbchen einzudämmen. Die Auszählung erfolgte bei 500facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop.

3.3 Zur Trockengewichtsbestimmung erfolgte eine Filtration der Proben durch Sartorius-Membranfilter (SM; 0,45 µm), die Trocknung auf dem Filter erstreckte sich über 24 Stunden bei 70° C.

3.4 Zur Proteinbestimmung wurden 4 ml Suspension in Zentrifugengläser pipettiert und zentrifugiert. Die Zellen wurden nach Dekantieren in 4 ml dest. Wasser aufgeschwemmt und mit 0,4 ml der Lösung A versetzt. Nach fünfminütigem Kochen im geschlossenen Wasserbad erfolgte rasches Abkühlen auf Zimmertemperatur und Zugabe von 1,6 ml der Lösung B. Das Ganze wurde gut geschüttelt und 20 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach einem zweiten Zentrifugieren über 10 Minuten bei 4000 U./Min. ließ sich für den klaren Überstand in 1 cm Küvetten bei 546 nm die Extinktion bestimmen. Unter diesen Bedingungen entsprachen 0,1 Extinktion 2,2 mg Rinderserumprotein im Ansatz.

Lösung A	16	g NaOH/100 ml H_2O
Lösung B	5	g Kalium-Natriumtartrat
	1	g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
	2,5	g Kaliumjodid
	4	g NaOH
	400	ml dest. Wasser

4. Zuckeranalytik

4.1 Enzymatische Glucosebestimmung

Die Bestimmungen wurden mit dem UV-Test mit $NADP^+$ nach Boehringer[1] vorgenommen. Dabei wird Glucose in der durch Hexokinase katalysierten enzymatischen Reaktion durch ATP zu G-6-P phosphoryliert. Durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wird G-6-P in Gegenwart von $NADP^+$ in 6-P-Gluconat überführt:

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{G-6-P} + NADP^+ \longrightarrow \text{6-P-Gluconat} + NADPH + H^+$$

Die aus $NADP^+$ entstehende NADPH-Menge ist äquivalent der G-6-P- bzw. Glucose-Menge und kann auf Grund ihrer Absorption bei 366 nm gemessen werden.
Die Proben wurden nach der in der Test-Fibel (2. Auflage, 1967) angegebenen Methode bearbeitet.

4.2 Zuckerbestimmung mit dem Autoanalyzer

Mit dem Autoanalyzer von Technicon wurden die reduzierenden Substanzen (Zucker) in folgender Weise bestimmt: Zur Aufzeichnung der Grundlinie (Extinktion 0) wurde zunächst Wasser durch das Gerät geschickt (maximale Lichtdurchlässigkeit). Danach liefen die Lösungen A + B durch und ergaben maximale Lichtschwächung (Extinktion ca. 980). Bei Durchlauf der Lösungen A + B mit der Probe wurde durch reduzierende Substanz Lösung B entfärbt, die Lichtdurchlässigkeit [illegible] und wurde gemessen. In regelmäßigen Abständen liefen Standardproben mit den Konzentrationen 0, [illegible], 0,2, 0,3,

---

1) Biochemica-Test-Combination Glucose, TC-X-I,
Art.-Nr.: 15994 TGAA.

0,4 und 0,5 mg/ml mit.

Lösung A:	NaCl	9,0 g
	H_2O	1000 ml
Lösung B:	NaCl	45 g
	$K_3Fe(CN)_6$	7,2 g
	Na_2CO_3	100 g
	H_2O	5 l

5. Dünnschichtchromatographische Harnstoffbestimmung (modifiziert nach RAUEN (Hrsg.), 1964)

Entsprechend der zu erwartenden Probenmenge wurden die Standards ausgewählt (0,1 bis 0,8 %), hiervon wurden je 2 µl auf die Platten aufgetragen, dazu kamen dann die Proben. Nach Trocknen der Startpunkte mit dem Föhn wurde in Butanol : Essigsäure : Wasser = 4 : 1 : 1 entwickelt. Nach 2 Stunden erfolgte Trocknung der Platten mit dem Föhn und Ansprühen mit 1,0 g Dimethylaminobenzaldehyd in Äthanol : Salzsäure (konz.) = 95 ml : 5 ml. Die hellen gelben Flecken konnten bei Tageslicht und unter UV-Licht bis zu einer Grenze von 0,05 % gut ausgeschätzt werden.

6. Manometrische Messungen

Gaswechselmessungen wurden in einer Warburg-Apparatur (Fa. Braun, Melsungen, "S 85 G") durchgeführt. Die Schüttelfrequenz betrug 100 Ausschläge/Min. bei einer Amplitude von 4 cm, die Inkubationstemperatur 30° C.

7. Sauerstoffbestimmungen

Dem Einfluß des Sauerstoffs auf die Mikroorganismen wird zunehmend grössere Bedeutung beigemessen. Dabei steht der Leistungsfähigkeit der Apparatur, gekennzeichnet durch die Bauweise, die Belüftungsweise und das Rührsystem, der Bedarf des jeweiligen Organismus gegenüber.

7.1 Leistungsfähigkeit der Apparatur

Für 500 ml Erlenmeyer mit 100 ml Füllung (mit und ohne Schikanen) sowie für 5 Liter Belüftungskolben mit 3 Liter Füllung wurden die Sauerstoffübergangskoeffizienten nach der Methode von COOPER et al. (1944) bestimmt (Cu^{++} als Katalysator). Nach

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a \, (C_E - C_L)$$

gilt bei der Sulfitmethode ($C_L = 0$)

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a \cdot C_E$$

Aus der Geschwindigkeit des Sulfitverbrauchs ergibt sich die OAR. Das nicht oxydierte Sulfit reduziert Jod zu Jodid und das nicht reduzierte Jod wird mit Thiosulfat titriert.

$$2\,SO_3^{2-} + O_2 \longrightarrow 2\,SO_4^{2-}$$

$$2\,SO_3^{2-} + 2\,J_2 + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,SO_4^{2-} + 4\,J^- + 4\,H^+$$

$$4\,S_2O_3^{2-} + 2\,J_2 \longrightarrow 2\,S_4O_6^{2-} + 4\,J^-$$

---

4 mmole $S_2O_3^{2-}$ = 2 mmole J_2 = 2 mmole SO_3^{2-} = 1 mmol O_2

d.h. 1 ml 0,1 n $S_2O_3^{2-}$ = $25 \cdot 10^{-3}$ mmole O_2 = 0,8 mg O_2

Die benötigten Reagenzien wurden in folgender Weise hergestellt:

0,5 N-Natriumsulfitlösung: 63,04 g $Na_2SO_3 \cdot 7\ H_2O$ und
0,25 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ pro Liter.

0,1 N-Jodlösung: 12,692 g Jod in einer Lösung von 25 g KJ in 35 ml dest. Wasser lösen, anschließend auf 1000 ml auffüllen.

0,1 N-Natriumthiosulfatlösung: 25 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$ in Meßkolben mit ausgekochtem Wasser auf 1000 ml auffüllen. Faktor mit $K_2Cr_2O_7$ einstellen.

0,1 N-Kaliumdichromatlösung: 4,9037 g $K_2Cr_2O_7$ in dest. Wasser lösen, auf 1000 ml auffüllen.

Stärkelösung: 4 g lösliche Stärke und 0,01 g HgJ_2 in kochendem dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.

2 N-Schwefelsäure

Die Bearbeitung der Proben geschah so, daß zu 30 ml Jodlösung und 5 ml 2 N-Schwefelsäure vorsichtig 5 ml Probe pipettiert und unter Zusatz von 5 ml Stärkelösung gegen Natriumthiosulfat farblos titriert wurde.
Die Berechnung geschah nach folgender Formel:

$$K_L a \cdot C_E = \frac{(b - a) \cdot F \cdot 200 \cdot 0,8}{1000 \cdot 0,032} = \text{mmole } O_2/l \cdot h$$

a = ml 0,1 N - $Na_2S_2O_3$ in der 0. Std.
b = ml 0,1 N - $Na_2S_2O_3$ nach t
F = Faktor 0,1 N - $Na_2S_2O_3$

7.2 Bestimmung von $K_L a$ in Fermentationsbrühe

Nach den Angaben von TAGUCHI und HUMPHREY (1966) wurde in folgender Weise vorgegangen:

O_2-Konsumptionsrate nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr:

$$\frac{dC_L}{dt} = - Qx$$

Änderung der O_2-Konzentration ohne Verbrauch durch den Organismus:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a \, (C_E - C_L)$$

Wenn die O_2-Aufnahmerate und die O_2-Verbrauchsrate gleich groß sind, stellt sich in der Fermentationslösung folgendes Gleichgewicht ein:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a \, (C_E - C_L) - Qx$$

Durch Umformen läßt sich dieser Ausdruck in eine der allgemeinen Gleichung $y = ax + b$ entsprechende Form bringen:

$$C_L = - \frac{1}{K_L a} \left(\frac{dC_L}{dt} + Qx\right) + C_E$$

Um $K_L a$ zu ermitteln, muß als einzige Größe die O_2-Konzentration in der Fermentationslösung zu verschiedenen Zeiten bekannt sein. Sie wurde mit Hilfe einer polarographischen O_2-Elektrode kontinuierlich gemessen. Die Auswertung erfolgte graphisch.

7.3 Polarographische Bestimmung des gelösten Sauerstoffs

Zur Messung wurde ein Meßsystem der Firma SENSORLABS[1] verwendet. Die Elektrode besteht aus einer Pt-Kathode und einer Ag/AgCl-Anode. Die Kathode, an der der Sauerstoff reduziert wird, ist vom Medium durch eine dünne Elektrolytschicht und eine polymere Membran getrennt. Die Membran ist für Sauerstoff durchlässig, nicht aber für Ionen und Proteine, sie erlaubt wiederholte Dampfsterilisation in eingebautem Zustand bis 126° C. Der entstehende elektrische Strom ist proportional zum Partialdruck des in der Probe gelösten Sauerstoffs. Zur Eichung wurde die Elektrode in mit Luft gesättigte Nährlösung eingetaucht und diese Anzeige gleich 160 mm Hg gesetzt. Es wurde dann festgestellt, daß die Anzeige in einer durch Stickstoffdurchfluß sauerstoffrei gemachten Nährlösung Null ist.

7.4 Chemische Bestimmung des gelösten Sauerstoffs nach WINKLER (1914)

Durch Zugabe von Mangan-II-chlorid und Kalilauge zu der auf Sauerstoff zu untersuchenden Probe entsteht ein Niederschlag von Mangan-II-hydroxyd, welcher durch den in Wasser gelösten Sauerstoff oxydiert wird. Es bilden sich dabei Mangan-II-Manganite. Dies sind salzartige Verbindungen des II-wertigen Mangans mit der IV-wertigen manganigen Säure, die in stark alkalischen Medien unlöslich sind. Beim Ansäuern gehen sie gemäß der Gleichung

$$Mn^{4+} + Mn^{2+} \longrightarrow 2\,Mn^{3+}$$

in Mangan-III-Salze über. Diese vermögen aus Jodidlösungen Jod freizumachen, welches mit Natriumthiosulfat titriert werden kann:

$$2\,Mn^{3+} + 2\,J^{-} \longrightarrow 2\,Mn^{2+} + J_2$$

$$2\,Na_2S_2O_3 + J_2 \longrightarrow Na_2S_4O_6 + 2\,NaJ$$

---

1) Eine Abteilung von Instrumentation Laboratory Inc., Lexington, Mass.

Bei der Bestimmung wurden zunächst Probenflaschen mit genau bekanntem Volumen zwischen 110 und 130 ml mit der zu untersuchenden Suspension gefüllt. Nach Zusatz von 1 ml Lösung A und 1 ml Lösung B wurden die Flaschen verschlossen und geschüttelt, sodann wurde 0,5 g festes Natriumhydrogenkarbonat zugefügt, wieder verschlossen und geschüttelt. Nach Absitzenlassen des Niederschlages und vorsichtigem Absaugen der überstehenden Lösung wurden 0,5 ml einer konzentrierten Kaliumjodidlösung und 2 ml Phosphorsäure (85 % p.a.) zugesetzt. Die Flaschen mußten 10 Minuten im Dunkeln stehen, dann konnte das freigesetzte Jod mit einer 0,01 N-Thiosulfatlösung titriert werden. Gegen Ende der Titration sollte man - um den Endpunkt besser ermitteln zu können - 1 ml Zinkjodid-Stärkelösung zufügen und die nun dunkelblaue Lösung farblos titrieren.

Lösung A: 800 g $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ p.a. und
1 Liter dest. Wasser.

Lösung B: 360 g NaOH, nitritfrei, und 5 g NaN_3
mit dest. Wasser zu 1 Liter lösen,
durch Glaswolle filtrieren.

Die Auswertung geschah nach folgender Formel:

$$G = \frac{a \cdot 0,08 \cdot 1000}{b - c}$$

1 ml 0,01 N-Natriumthiosulfat-Lösung entspricht 0,08 mg Sauerstoff.

a: Verbrauch an 0,01 Natriumthiosulfat-Lösung in ml,

b: Volumen der Sauerstofflasche in ml,

c: Gesamtvolumen der zugesetzten Reagenzien in ml,

G: Gehalt an Sauerstoff in mg/l.

8. Steroidanalytik

8.1 Dünnschichtchromatographie (modifiziert nach STAHL, 1967)

Bestimmt wurden Hydrocortison, Hydrocortison-17-Acetat und Prednisolon. Die Standardmengen lagen bei 0,5, 1, 3 und 7,5 µg (25 und 75 mg Steroid in 50 ml Methanol gelöst, 1 und 2 µl aus 25 mg/50 ml, 2 und 5 µl aus 75 mg/50 ml aufgetragen). Bei der Vorbereitung der Proben wurden im allgemeinen jeweils 10 ml Fermentationslösung zweimal mit je 25 ml Methylisobutylketon ausgeschüttelt, eingeengt und so gelöst, daß 2 µg/µl vorlagen.
Nach Auftragen von Standards und Proben trocknete die Platte 5 Minuten an der Luft, dann wurde im System Benzol : Aceton = 3 : 1 entwickelt. Hatte die Lösungsmittelfront ca. 3/4 der Plattenhöhe erreicht, konnte die Platte herausgenommen und getrocknet werden. Danach wurde zur besseren Trennung von Hydrocortison und Prednisolon ein zweites Mal entwickelt. Nach abermaligem Trocknen wurde mit Äthanol : Phosphorsäure = 4 : 1 angesprüht, 15 Minuten bei 120° C getrocknet und unter UV-Licht ausgeschätzt. Mußten kleinere Steroidmengen bestimmt werden, wurden 10 µg/µl gelöst.

Verwendet wurden DC-Fertigplatten mit Kieselgel (ohne Fluoreszenzindikator), 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 cm, der Firma Merck AG, Darmstadt.

8.2 Papierchromatographie (modifiziert nach NEHER, 1964)

Diese Methode wurde zur quantitativen Bestimmung von Prednisolon eingesetzt.
Proben von je 100 ml Kulturbrühe wurden zweimal mit je 100 ml Methylisobutylketon (MibK) extrahiert und die vereinigten MibK-Extrakte im Vakuum bei 80° C eingeengt. Anschließend wurden die Proben so in Methanol gelöst, daß 6 µg Substanz in 1 µl vorhanden waren, genau wie der Standard. Davon wurden jeweils 25 µl auf die Papierstreifen aufgetragen. Das Chromatogra-

phiersystem setzte sich aus 2 l Toluol, 0,47 l Methanol und 0,2 l Wasser zusammen. Nach Schütteln und Trennung der Phasen wurde im Scheidetrichter die Unterphase abgetrennt; sie diente zur Trogsättigung und zum Befeuchten von Filterpapier, mit dem der Rand des Troges ausgekleidet war. 30 Minuten nach Einhängen der Papierstreifen begann die Entwicklung durch Zugabe der Oberphase, sie dauerte 10 Stunden. Nach Ende der Laufzeit wurde zur Entfernung von Toluolspuren 5 - 6 Minuten gedämpft. Danach wurden die Zonen im UV-Licht markiert und ausgeschnitten. 20 ml Reagenzgläser mit Schliffstopfen, mit 10 ml gereinigtem Methanol gefüllt, nahmen die Zonen auf. Nach mehrmaligem sorgfältigen Schütteln wurden die Messungen im Zeiss-Spektralphotometer PM 4 mit Transmission-Konzentration-Rechner und Drucker ausgewertet:

$$\frac{\text{Ext.}_{\text{Probe}} : 100}{\text{Ext.}_{\text{Standard}}} = \% \text{ Prednisolon}$$

Verwendet wurden Papierstreifen der Firma Schleier und Schüll (Nr. 2043a, 14 x 45 cm, 5 Streifen).

9. Bereitung zellfreier Extrakte

Nach Anzucht in FP-Medium wurden die Zellen gegen Ende der logarithmischen Phase geerntet. Es wurde zentrifugiert und in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Zerstörung der Zellen erfolgte in einer Vibriogen-Zellmühle der Fa. Bühler, Tübingen, mit Glasperlen (0,11 mm Durchmesser). Die Laufzeit betrug 20 bis 30 Minuten, es wurde gekühlt und zum Schluß durch Fritten (G-3) filtriert.

10. Herstellung der Phosphatpufferlösung

Es wurden 368 ml einer Lösung I und 632 ml einer Lösung II zu 1000 ml zusammengegeben.

Lösung I 45,0 g Na_2HPO_4/1000 ml

Lösung II 36,3 g KH_2PO_4/1000 ml

Der resultierende pH-Wert betrug 6,5.

11. Chemikalien

Die Chemikalien stammten im wesentlichen von den Firmen
BOEHRINGER, Mannheim
DIFCO LABORATORIES, Detroit
MERCK AG, Darmstadt
OXOID LIMITED, London
SCHERING AG, Berlin und Bergkamen

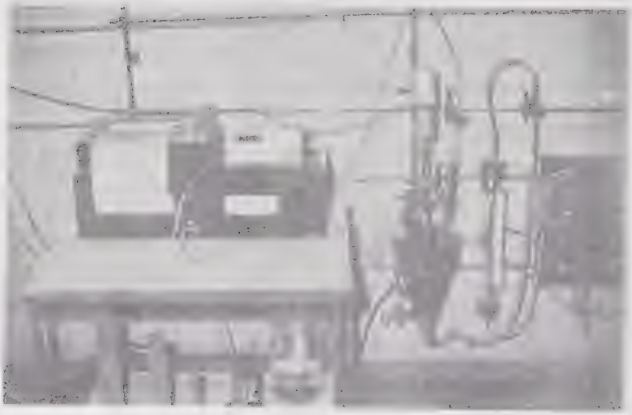
12. Aufbau der Versuchsanlage

Wachstum und Steroidumwandlung wurden in einer Versuchsanlage durchgeführt, deren Reaktionsgefäß aus einem 5 Liter Belüftungskolben bestand. Begast wurde von unten über eine Fritte, nachdem das jeweilige Gasgemisch einen Strömungsmesser zur Mengenregulierung durchströmt hatte. Kurz oberhalb der Fritte stand ein Hahn zur Verfügung, um schnelle Probenentnahme zu ermöglichen. Drei Öffnungen an der Oberseite dienten zur Durchführung von Rührer, Sauerstoff- und pH-Elektrode. Von oben wurden ebenfalls Nährstoffe, Steroid und Antischaummittel zugesetzt. Sterilitätsprobleme traten nicht auf.

Bild 1 und 2

Reaktionsgefäß und

Versuchsanlage



Der Belüftungskolben mit einem Fassungsvermögen von 5 Litern ist an der Oberseite mit drei Öffnungen für die Durchführung von (von links nach rechts) pH-Elektrode, Rührer und Sauerstoffelektrode versehen. Links unten ist ein Hahn zur Probenentnahme angebracht. Gasdurchfluß über eine Fritte, die Durchflußmenge wird über einen Strömungsmesser reguliert.

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

A. Bestimmung des Stammes nach bakteriologischen Identifizierungsmethoden

Um zunächst eine einheitliche Ausgangskultur für die Versuche zu erhalten, wurde von dem von der Firma Schering AG zur Verfügung gestellten Organismus mit der Bezeichnung TK 132 B, nach Anzucht in FP-Medium, eine Verdünnungsreihe angelegt und über Platten mit FP-Agar Einzelkolonien erzeugt.

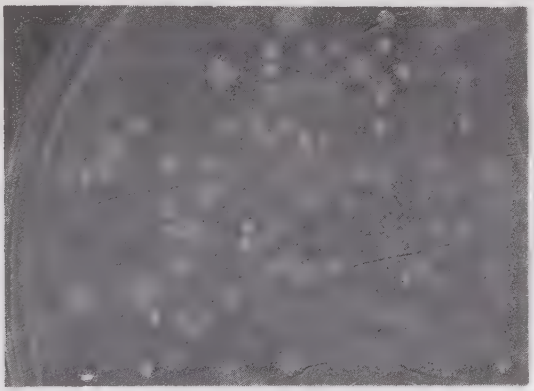


Bild 3 Einzelkolonien nach Anzucht in FP-Medium und Verdünnungsreihe auf FP-Agar

Wie Bild 3 zeigt, konnten dabei zwei Kolonietypen unterschieden werden, der eine gekennzeichnet durch rauhe Oberfläche und zerfransten Rand, der andere mit glatter Oberfläche und glattrandig. Von beiden Kolonieformen wurde je eine Trockencharge angelegt und in einer Reihe von Versuchen ihre Eigenschaften miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß keine grundlegenden Unterschiede vorlagen. Die aus einer Kolonie mit glattem Rand und glatter Oberfläche hergestellte Charge TK 144 B bildete beim Wachstum

etwas kleinere und sehr gleichmäßige Stäbchen, die Werte für Wachstumsgeschwindigkeit, Ertrag und Aktivität gegen Steroide lagen etwas höher, so daß diese Kultur für die folgenden Untersuchungen eingesetzt wurde.

Die Länge der Stäbchen lag je nach Art der angebotenen Nährstoffe und je nach Alter der Kultur zwischen 1 und 5 µm, die Dicke betrug etwa 0,8 µm. Die Enden der Stäbchen waren leicht gerundet, gelegentlich bildeten sich kurze Ketten, die Stäbchen waren beweglich und färbten sich gramnegativ, manchmal mit grampositiven Einlagerungen.

Unter Verwendung besonderer, die Sporenbildung fördernder Nährböden (GIBSON, 1935) konnte Sporenbildung registriert werden. Die Sporenform war ellipsoid, in älteren Stadien mehr rundlich, die Sporangien waren deutlich geschwollen und hatten in der Regel Trommelschlegelform.

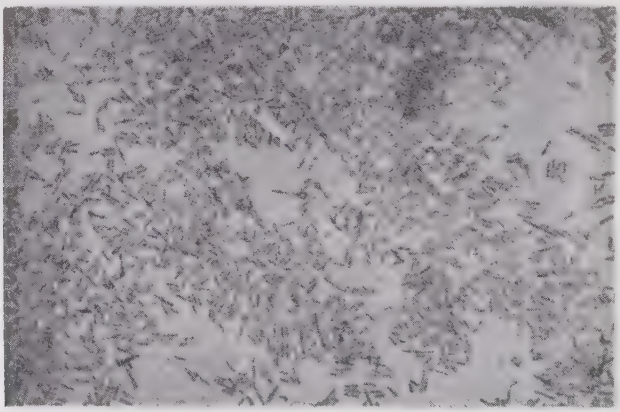


Bild 4 Sporenbildung auf Nährboden nach GIBSON (1935) und Färbung nach BARTHOLOMEW und MITTWER (1950)

Die Sporengröße lag zwischen 1 und 1,2µm, die Wände waren kräftig ausgebildet, Reste der Sporangien blieben manchmal an der Spore haften.

Unter Zugrundelegung des Bestimmungsschlüssels von BERGEY'S MANUAL (1957) handelt es sich um einen Organismus aus der Familie der Bacillaceae. Die Sporenform erlaubt die Einordnung in die von SMITH et al. (1952) definierte morphologische Gruppe III, in der alle die Organismen zusammengefaßt werden, deren Sporen deutlich geschwollen und von mehr rundlicher Form sind.

Als wesentliche Kriterien für die weitere Identifizierung sind folgende Versuchsergebnisse hervorzuheben: Hydrolyse von Stärke (-), Hydrolyse von Casein (-), Hydrolyse von Gelatine (+), Hydrolyse von Harnstoff (+), Säurebildung aus Kohlenhydraten (-). Aus diesen und noch weiteren Testergebnissen, die alle in Tabelle 1 zusammengestellt sind, ist abzuleiten, daß der Testorganismus als Bacillus sphaericus var. fusiformis bezeichnet werden kann.

Tab. 1 Ergebnisse des Bestimmungstestes

Test	Testorganismus TK 144 B	Bacillus sphaericus ATCC 7055
Morphologische Gruppe nach Sporenform	3	3
Hydrolyse von Stärke	-	-
Hydrolyse von Casein	-	-
Hydrolyse von Gelatine	+	+
Hydrolyse von Lecithin	-	-
Hydrolyse von Harnstoff	+	+
Voges-Proskauer-Reaktion	-	-
Reduktion von Nitrat zu Nitrit	-	-
Vergärung von Citrat	-	-
Wachstum auf Glucose-Nitrat-Agar	-	-
Anaerobes Wachstum in Glucose	-	-
Säurebildung aus Glucose	-	-
Säurebildung aus Lactose	-	-
Säurebildung aus Maltose	-	-
Säurebildung aus Mannit	-	-
Säurebildung aus Salizin	-	-
Wachstum in 4 % NaCl	+	+
Wachstum in 10 % NaCl	-	-
Wachstumsoptimum	38	28 - 35
Wachstumsmaximum	45	40 - 45
Wachstum bei pH 6,0	+	+
Wachstum bei pH 7,0	+	+
Wachstum mit Biotin/Thiamin	+	+
Wachstum ohne Biotin/Thiamin	-	-
Bildung von Indol	-	-
Entfärbung von Methylenblau	+	+
Δ^1-Dehydrogenase	+	+

B. Ermittlung von Nährstoffbedürfnissen durch Versuche mit synthetischen Medien

1. Bestimmung der Wachstumsparameter in synthetischem Minimalmedium

Nach Angaben von KNIGHT und PROOM (1950) sowie PROOM und KNIGHT (1953), die für verschiedene sporenbildende Bakterien die Zusammensetzung synthetischer Medien ermittelt haben, wurden erste Versuche durchgeführt. Für den Testorganismus wurde die im methodischen Teil angegebene Zusammensetzung aus Mineralsalzen, Vitaminen und Caseinhydrolysat erarbeitet; sie erlaubte ein zufriedenstellendes Wachstum. Die Versuche liefen nach dem in Abb. 1 angegebenen Fließschema ab.

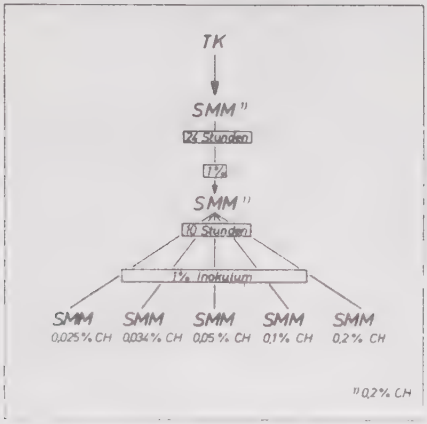


Abb. 1 Fließschema der Wachstumsversuche in synthetischem Medium

Nach Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen von Caseinhydrolysat zeig

Ertrag beeinflußt wird. In Abbildung 2 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt, wobei jeder Meßpunkt dem Mittelwert aus fünf Einzelwerten entspricht.

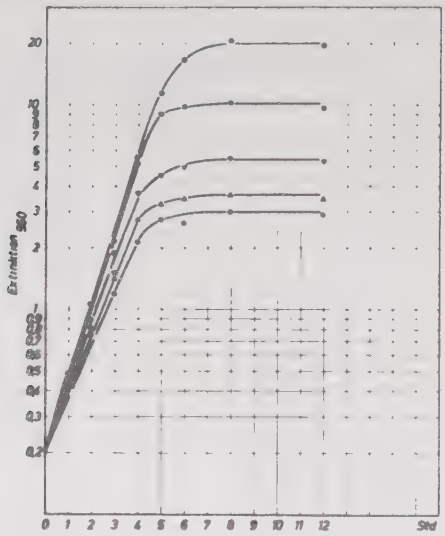


Abb. 2 Wachstumsverlauf in Abhängigkeit von der Caseinhydrolysatkonzentration

Die Versuche wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml synthetischem Medium bei Caseinhydrolysatkonzentrationen zwischen 0,025 und 0,2 % durchgeführt. Die Temperatur betrug 30° C und die Schüttelfrequenz des Rotationsschüttlers lag bei 175 U/Min.

—o—o— 0,025 % CH
—▲—▲— 0,034 % CH
—▼—▼— 0,05 % CH
—□—□— 0,1 % CH
—●—●— 0,2 % CH

Aus der Trübungsmessung, die ja eine Zellmassebestimmung ist, lassen sich Wachstumsgeschwindigkeit μ und Verdopplungszeit t_d direkt berechnen.

Die Parameter, die sich auf die Zellzahl beziehen, nämlich Teilungsrate γ und Generationszeit g, können aus der Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt werden, wenn während der logarithmischen Phase die Zunahme der Zellmasse gleich der Zunahme der Zellzahl ist (Standardzellen [1]). Die Ergebnisse wurden in Tab. 2 zusammengestellt. Der Berechnung lagen folgende Formeln zugrunde (SCHLEGEL, 1969):

$$\mu = \frac{\log X_t - \log X_o}{\log e\,(t - t_o)}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = g$$

$$\gamma = \frac{\mu}{\ln 2}$$

Tab. 2 Wachstumsparameter in synthetischem Minimalmedium

CH (%)	0,025	0,034	0,05	0,1	0,2
μ (Std^{-1})	0,60	0,66	0,68	0,76	0,81
t_d (Min)	70	63	61	55	52
ν (Std^{-1})	0,87	0,95	0,98	1,10	1,17 [1]
g (Min)	70	63	61	55	52
E_E (Ertrag Extinktion 650)	3,00	3,62	5,50	10,15	20,65
E_P (Ertrag Protein mg/ml)	0,04	0,07	0,1	0,21	0,45
E_{TG} (Ertrag Trockengew. mg/l)	74	90	150	266	495

1) Die Bestimmung der Teilungsrate aus der Zellzahl (Helber-Kammer) ergab $\gamma = 1,15$. Rechnerisch ergibt sich aus der Wachstumsgeschwindigkeit $\gamma = \mu / \ln 2 = 0,81/0,693 = 1,17$. Die Übereinstimmung beider Werte zeigt, daß Standardzellen vorliegen.

Die Abhängigkeit des Ertrags und der Wachstumsgeschwindigkeit von der Caseinhydrolysatkonzentration ist in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

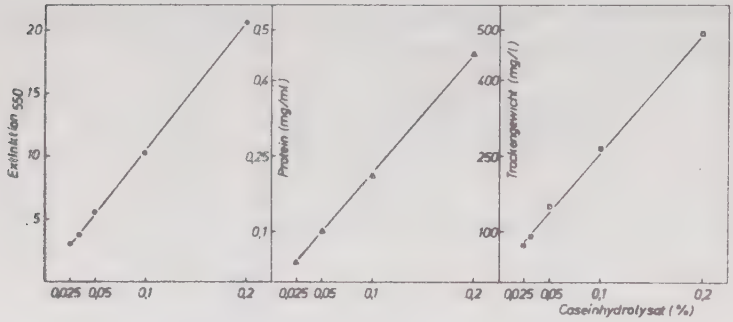


Abb. 3 Trübung, Protein und Trockengewicht in Abhängigkeit von der Caseinhydrolysatkonzentration des synthetischen Mediums (10. Stunde)

500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml synthetischem Medium (CH zwischen 0,025 und 0,2 % variiert) wurden mit 1 % Inoculum aus einem Anzuchtkolben mit ebenfalls synthetischem Medium (0,2 % CH) beimpft, bei 30° C und 175 U/Min. geschüttelt und die Erträge zur 10. Stunde nach verschiedenen Methoden bestimmt.

Schließlich wurden, bezogen auf Caseinhydrolysat, die maximale Wachstumsgeschwindigkeit (μ_{max}) und die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) graphisch nach der Lineweaver-Burk-Auftragung bestimmt.

Aus der Abbildung 5 ergeben sich folgende Werte:

$$\frac{1}{\mu_{max}} = 1,18; \qquad \mu_{max} = 0,85\ (h^{-1})$$

$$\frac{1}{K_m} = -96; \qquad K_m = 0,0104\ (\%\ CH)$$

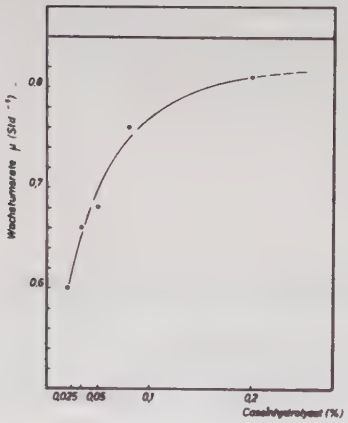


Abb. 4 Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Caseinhydrolysatkonzentration des synthetischen Mediums

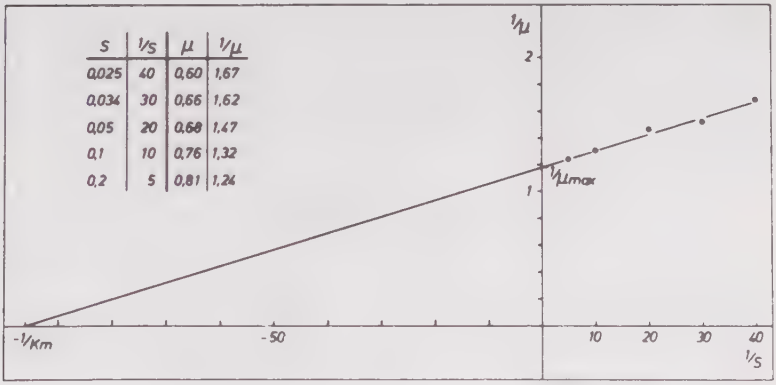


Abb. 5 Lineweaver-Burk-Auftragung zur graphischen Bestimmung von μ_{max} und K_m

Als wesentlich ist festzuhalten, daß Aminosäuren Wachstumsgeschwindigkeit und Ertrag beeinflussen können und daß ein 0,2 %iger Caseinhydrolysatzusatz schon fast maximale Wachstumsgeschwindigkeit ermöglicht. Offensichtlich kann der Organismus die Aminosäuren sowohl als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle verwerten.

II. Einfluß einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle

Um im Hinblick auf optimale Zusammensetzung eines Vollmediums weitere Hinweise zu erhalten, wurden dem synthetischen Minimalmedium einige einfache Zucker zugesetzt.

1. Submersversuche

Dem synthetischen Medium mit 0,2 % Caseinhydrolysat wurde zunächst Glucose in steriler Form bis zu einer Endkonzentration von 2 % zugesetzt. Im Wachstumsablauf zeigten sich aber keine Unterschiede zu den Kontrollkolben ohne Glucose. Die analytische Glucosebestimmung nach der Hexokinase-Methode ergab, wie Abb. 6 zeigt, keinen Glucoseverbrauch während 26-stündiger Laufzeit.

Um dieses Ergebnis abzusichern, wurden die Zucker Glucose, Lactose, Maltose, Arabinose, Ribose und Xylose in den Konzentrationen 0,25 bis 2 % bei Caseinhydrolysatkonzentrationen zwischen 0,025 und 0,2 % zugesetzt und ihr eventueller Verbrauch während der Versuchszeit mit dem Autoanalyzer verfolgt.

In keinem Fall konnte ein Verbrauch festgestellt werden (Abb. 7), ebensowenig änderten sich Wachstumsgeschwindigkeit oder Ertrag.

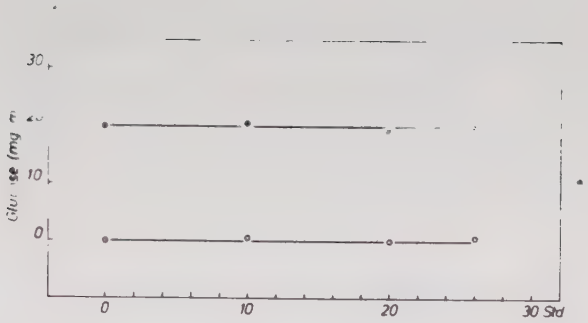


Abb. 6 Glucosebestimmung in Schüttelkolben mit synthetischem Medium nach der Hexokinase-Methode

500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml synthetischem Medium (0,2 % CH) ohne und mit Zusatz von 2 % Glucose wurden mit 1 % Inoculum aus einer Anzuchtsuspension beimpft, bei 30° C und 175 U/Min. 26 Stunden geschüttelt und zur 0., 10., 20. und 26. Stunde der Glucosegehalt bestimmt.

—●——●— 20 mg/ml Glucose

—o——o— Kontrollkolben ohne Glucose

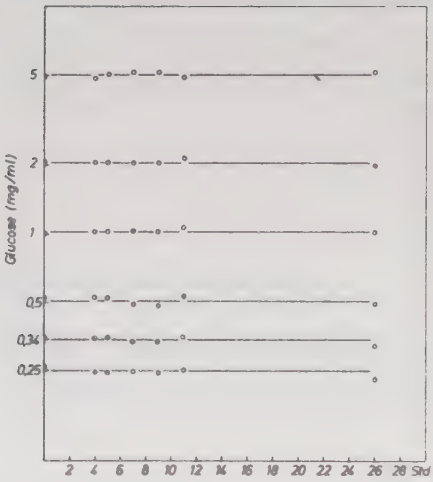


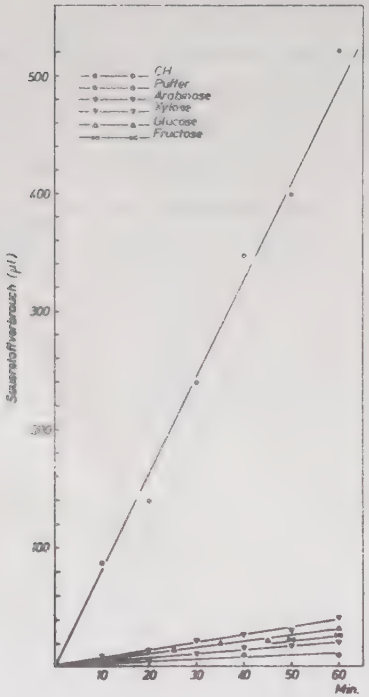
Abb. 7 Glucosebestimmung in Schüttelkolben und synthetischem Medium mit dem Autoanalyzer

500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml synthetischem Medium (0,2 %) ohne und mit Glucosezusatz in den Konzentrationen zwischen 0,25 und 5 % wurden mit 1 % Inoculum aus einer Anzuchtsuspension beimpft, bei 30° C und 175 U/Min. 26 Stunden geschüttelt und zur 0., 4., 5., 7., 9., 11. und 26. Stunde mit dem Autoanalyzer von Technicon der Glucosegehalt bestimmt.

2. Manometrische Versuche

Auch in einer Serie von manometrischen Versuchen wurde die Fähigkeit des Testorganismus geprüft, einfache Zucker veratmen zu können. Alle Versuche wurden mit 10 Stunden alten Zellen aus synthetischem Anzuchtmedium durchgeführt, nachdem sie zweimal zentrifugiert, gewaschen und in Phosphatpuffer aufgenommen worden waren. Folgende Zucker kamen zum Einsatz: Glucose, Lactose, Maltose, Saccharose, Fructose, Arabinose und Xylose.

Zur Kontrolle liefen Doppelproben mit Caseinhydrolysat und mit Puffer. Bei keinem der Zucker konnte ein über den Gasverbrauch in Pufferlösung hinausgehender Sauerstoffverbrauch festgestellt werden, bei Anwesenheit von Caseinhydrolysat entwickelte sich starke Atmung (Abbildungen 8 und 9). Die Versuchslaufzeit wurde bis auf 5 Stunden ausgedehnt, ohne daß sich ein höherer Sauerstoffverbrauch als in den Kontrollkolben ohne Zucker feststellen ließ. Ein Verbrauch von Zucker konnte also nicht nachgewiesen werden.



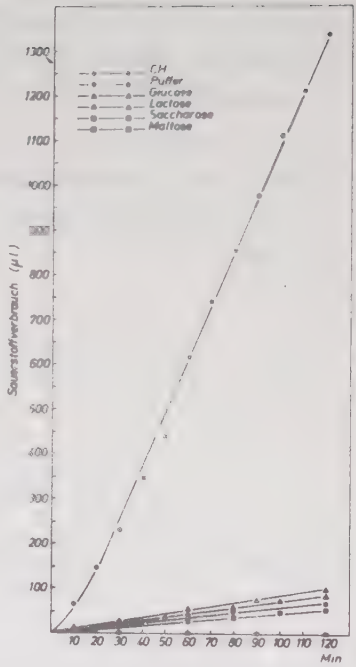


Abb. 8 und 9 Sauerstoffverbrauch bei 2 %igem Zusatz verschiedener Zucker, Caseinhydrolysat und in Phosphatpuffer

Die Bakterien waren in synthetischem Medium angezogen. Aus der beginnenden stationären Phase (10. Std.) wurden sie geerntet, zweimal in Phosphatpuffer gewaschen und dann in Phosphatpuffer aufgenommen. In den Hauptraum der Warburggefäße wurden jeweils 2,3 ml Zellsuspension (1 g TG/l), in den Zentralzylinder je 0,2 ml 2 N-KOH und in einen der Seitenarme 0,5 ml Caseinhydrolysat, Zucker oder Phosphatpuffer pipettiert, das gesamte Versuchsvolumen betrug also 3 ml. Nach einstündigem Schütteln bei geöffneten Hähnen wurden die Versuche nach dem Zusammenkippen gestartet (30° C).

III. Einfluß einer zusätzlichen Stickstoffquelle

Nachdem ein synthetisches Medium erarbeitet worden war, bei dem sowohl der Kohlenstoff- als auch der Stickstoffbedarf des Testorganismus durch das angebotene Caseinhydrolysat gedeckt werden konnte, und nachdem keine weitere verwertbare Kohlenstoffquelle in Form eines einfachen Zuckers gefunden werden konnte, schlossen sich orientierende Versuche an, welche die Verwertbarkeit verschiedener Stickstoffquellen klären sollten.

1. Harnstoff und Ammoniumchlorid in Verbindung mit einem 16-Aminosäure-Medium

Nach Angaben von PROOM und KNIGHT (1953) wurden synthetische Medien für Wachstumsversuche mit Bacillus-Kulturen eingesetzt, die folgende Aminosäuren enthielten: Alanin, Asparaginsäure, Arginin, Cystin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin. Vervollständigt wurde das Medium mit den schon genannten Mineralsalzen und Vitaminen. In diesem Grundmedium wurden direkt oder nach Zugabe von Harnstoff oder Ammoniumchlorid Wachstumsversuche mit folgendem Ergebnis gemacht:

Tab. 3 Ertrag nach Zusatz verschiedener Stickstoffquellen zu 16-AS-Medium

Zusatz zum Grundmedium (16 AS)	Ertrag nach 10 Std. $Extinktion_{550}$
-	kein Wachstum
NH_4Cl (1 %)	kein Wachstum
Harnstoff (1 %)	10

Im Rahmen dieses Grundmediums ist Harnstoff als Stickstoffquelle erforderlich.

2. Wirkung von Harnstoff in Verbindung mit Caseinhydrolysat

Nach Ersatz des 16-Aminosäureanteils durch das komplexe Caseinhydrolysat ergaben sich mit und ohne Zusatz von Harnstoff folgende Wachstumsverhältnisse:

Tab. 4 Wachstumsrate und Ertrag nach Zusatz von Harnstoff zu CH-Medium

Zusatz zum Grundmedium (CH)	Wachstumsrate (h^{-1})	Ertrag nach 10 Std. Extinktion$_{550}$
-	0,78	20
Harnstoff (1 %)	0,78	19

Parallel wurde dünnschichtchromatographisch der Harnstoffgehalt von der 0. bis 7. Stunde stündlich und dann zur 24. Stunde bestimmt. Es konnte keine Abnahme der Harnstoffmenge festgestellt werden.

Bei ausreichendem Angebot an Aminosäuren ist eine zusätzliche Stickstoffquelle nicht erforderlich.

IV. Einfluß von Vitaminen

Um einen Hinweis auf die Wirksamkeit von Biotin- und Thiaminzusätzen zu erhalten, wurden die Zugaben zum synthetischen Minimalmedium variiert und der Ertrag nach 12 Stunden Schüttelzeit bestimmt. Es zeigte sich, daß ohne diese Vitamine kein Wachstum möglich war und daß sich bei Steigerung der zugesetzten Mengen der Ertrag erhöhte (Abb. 10).

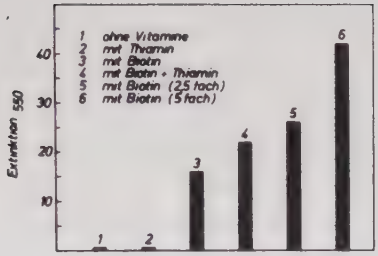


Abb. 10 Erträge in Abhängigkeit von Vitaminzusätzen

Die Versuche wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben und 100 ml synthetischem Medium durchgeführt. Zur 12. Stunde wurden die Erträge durch Trübungsmessungen bestimmt und verglichen.

V. Steroidumwandlung in synthetischem Medium

Ohne an dieser Stelle auf Einzelheiten einzugehen, soll kurz mitgeteilt werden, daß eine Dehydrogenierung von Hydrocortison zu Prednisolon mit dem Testorganismus auch in synthetischem Minimalmedium durchführbar ist. Die Substratbelastung und die Umwandlungsgeschwindigkeit waren aber sehr niedrig, insbesondere schon deshalb, weil die Bakteriendichte im Gegensatz zu Vollmedien auch niedrig war. Der Versuch wurde mit 50 mg F/l und einer Zellkonzentration von etwa 0,5 gTG/l gefahren. Nach 48 Stunden war etwa die Hälfte des Einsatzmaterials umgewandelt.

C. Versuche in Vollmedium

Unter Zugrundelegung der Versuchsergebnisse mit synthetischen Medien lassen sich Hinweise ableiten, wie ein für schnelles Wachstum und hohen Ertrag optimales Vollmedium beschaffen sein sollte. Es müssen in erster Linie eiweiß- und vitaminreiche Nährstoffe wie Fleischextrakt, Pepton und Hefeextrakt verwendet werden. Zucker als Kohlenstoffquelle und Harnstoff oder Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle sind nicht geeignet.

Dabei ist nicht zu erwarten, daß die Wachstumsgeschwindigkeit noch wesentlich zu beschleunigen sein wird. Die für synthetisches Medium ermittelte maximale Wachstumsrate von 0,85 wurde bei Zusatz von 0,2 % Caseinhydrolysat mit 0,81 schon fast erreicht. Die Zellmasse sollte sich aber durch geeignete Nährstoffzusammensetzung und -konzentration noch wesentlich steigern lassen. Ausgehend von der zunächst hypothetischen Vorstellung, daß die Art der Anzucht nur geringen, die Größe der Zellmasse aber den wesentlichen Einfluß auf die Umwandlungsgeschwindigkeit von Steroiden ausübt, soll ein Hauptaugenmerk auf die Erzeugung hoher Zellkonzentrationen gelegt werden.

1. Wachstumsparameter des Grundmediums

Als Grundmedium wurde FP-Medium unter Zusatz von 0,1 % Hefeextrakt verwendet. Die Wachstumsparameter ergaben sich nach der für synthetisches Medium schon beschriebenen Arbeitsweise wie folgt:

Wachstumsrate μ : 0,78 (h^{-1})
Verdopplungszeit t_d : 53 (Min.)
Ertrag E_{TG}: 0,72 (g/l)

Die Zellmasse liegt jetzt zwar um etwa die Hälfte höher als bei synthetischem Medium mit 0,2 % Caseinhydrolysat, es sollte aber noch eine erhebliche Ertragssteigerung möglich sein.

II. Erhöhung des Ertrages durch Änderung der Nährstoffzusammensetzung

Zusätze von je 0,5 %igen Mengen Caseinhydrolysat, Hefeextrakt, Pepton, Gelatine und Sojamehl wurden dem Grundmedium hinzugefügt und die Erträge nach zwölfstündigem Wachstum miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß Caseinhydrolysat sehr guten Ertrag brachte, desgleichen Hefeextrakt, nicht ganz so ertragreich war Pepton, und ohne deutliche Steigerungsraten erwiesen sich Gelatine und Sojamehl.

Weil Hefeextrakt als komplexer Nährstoff bekannt ist, der neben Aminosäuren auch Vitamine - insbesondere Biotin - enthält, wurde dieser Komponente besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Nach Anzucht in Belüftungskolben ergab sich die in Abb. 11 dargestellte Abhängigkeit des Ertrages von der Hefemenge. Der Verlauf der Kurve zeigt, daß mehr Hefeextrakt eine lineare Steigerung des Ertrages bedeutet.

Da neben anderen Faktoren der Sauerstoffbedarf hierbei um so größer wird je höher die Biomasse ist, sollen zunächst die apparativ bedingten Verhältnisse der Sauerstoffversorgung mit dem Bedarf der Kultur abgestimmt werden.

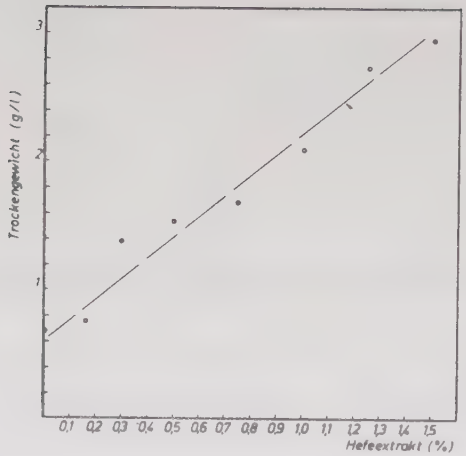


Abb. 11 Ertragssteigerung durch Erhöhung des Zusatzes von Hefeextrakt

Nach Anzucht in FP-Medium mit Zusatz verschiedener Hefeextraktmengen wurde die Suspension in der stationären Phase (12. Std.) über Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und 24 Stunden bei 70° C getrocknet.

III. Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf der Kultur

Es ist wünschenswert, das Sauerstoffangebot dem jeweiligen Bedarf der Kultur anzupassen. Nun ist dieser Bedarf oft nicht genau bekannt, und es ist darüberhinaus zu erwarten, daß er zu verschiedenen Wachstumsphasen unterschiedlich sein wird. Die wachsende Kultur in nährstoffreicher Suspension läßt höheren Sauerstoffverbrauch erwarten als die Kultur in stationärer Phase bei beginnendem Nährstoffmangel. Aus Sorge, einen kritischen Sauerstoffwert zu unterschreiten, wird man im allgemeinen so

vorgehen, daß man für einen sicheren Überschuß sorgt. Darüberhinaus ist zu bedenken, daß die Belüftung nicht nur der Versorgung der Kultur mit Sauerstoff dient, sondern auch der Durchmischung des Fermentationsmediums. Tritt also nach Änderung der Belüftungsintensität durch Variieren der Durchflußmenge in irgendeiner Form ein Effekt ein, möglicherweise eine Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit, so läßt sich nicht feststellen, ob die Ursache in der Änderung des Sauerstoffangebotes oder in der veränderten Mischungsintensität oder in beidem zu suchen ist. Ausgehend von dieser Überlegung wurde die Versuchsanordnung so gewählt, daß ein Variieren der Belüftungsintensität möglich war, ohne die Durchflußmenge und damit die Mischungsintensität ändern zu müssen. Zu diesem Zweck wurden Gasgemische (Stickstoff/Sauerstoff) mit unterschiedlichem Sauerstoffgehalt der Firma MESSER GRIESHEIM GMBH verwendet.

1. Bestimmung des Sauerstoffübergangskoeffizienten nach der Sulfitmethode

Die Belüftungsintensität wird wesentlich bestimmt durch das Belüftungssystem, die Gefäßform, die Füllhöhe und die Rührung. Alle Faktoren beeinflussen den Sauerstoffübergangskoeffizienten $K_L a \cdot C_E$ (mmole O_2/l · h), der mit Hilfe der Sulfitmethode nach COOPER et al. (1944) ermittelt werden kann.

Zunächst wurden Erlenmeyerkolben (500 ml) mit je 100 ml Füllung bei 30° C auf dem Rotationsschüttler (175 U/Min., Hub: 5 cm) getestet. Es standen neben den Normalkolben zwei Typen mit unterschiedlichen Schikanen zur Verfügung.

Von allen drei Typen wurden zunächst die $K_L a \cdot C_E$-Werte bestimmt und danach Wachstum und Ertrag in FP-Medium bei diesen Übergangskoeffizienten ermittelt.

Es ergab sich, daß die Wachstumsparameter unter den genannten Bedingungen in weitem Bereich vom Sauerstoffübergangskoeffizienten unabhängig waren (Abb. 12), so daß die in Schüttelkolben vorgesehenen Versuche in Kolben mit Normalform durchgeführt werden konnten ($K_L a \cdot C_E$: 12 mmole O_2/l · h).

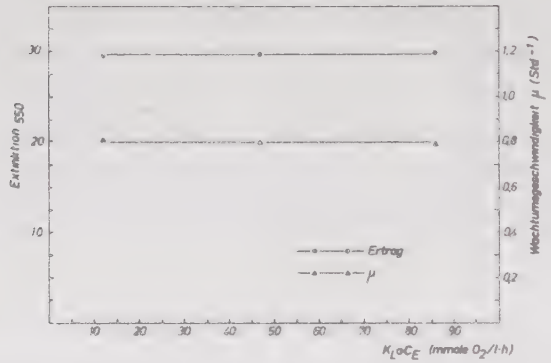


Abb. 12 Abhängigkeit des Ertrages und der Wachstumsgeschwindigkeit von der Belüftungsintensität in Schüttelkolben

Für 500 ml Belüftungskolben ohne und mit zwei verschiedenen Schikanentypen wurden zunächst die Sauerstoffübergangskoeffizienten nach der Sulfitmethode bestimmt (12, 48 und 86 mmole O_2/l · h). Hieran schloß sich die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeiten und Erträge in FP-Medium (0,1 % Hefeextrakt) an.

Der größere Teil der Versuche wurde in 5 Liter Belüftungskolben mit 2 Liter Füllung gemacht, und zwar immer dann, wenn größere Volumina zur Probenentnahme insbesondere für die Steroidanalytik nötig waren. Diese Kolben wurden mit 20 Litern Luft pro Stunde, pro Liter Füllung belüftet, was einem $K_L a \cdot C_E$ von 30,5 entsprach. Dieser Wert ändert sich natürlich, wenn statt mit Luft mit Sauerstoffgemischen unterschiedlicher Konzentration begast wird. Als Richtwerte sind in Abb. 13 die $K_L a \cdot C_E$-Werte

gigkeit vom Sauerstoffgehalt in Prozent des Gasgemisches dargestellt.

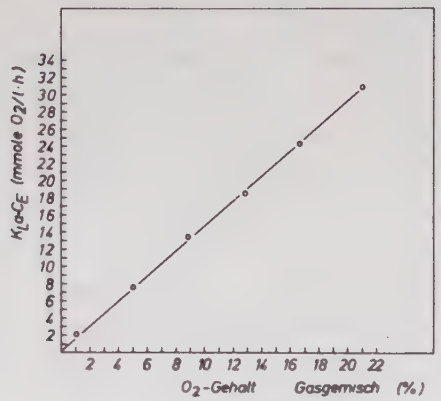


Abb. 13 Abhängigkeit des $K_L a \cdot C_E$-Wertes vom Sauerstoffgehalt des für die Belüftung verwendeten Gasgemisches

In 5 Liter Belüftungskolben wurden 3 Liter Sulfitlösung mit jeweils 20 l/l · h verschiedener Stickstoff/Sauerstoffgemische von unterschiedlichem Sauerstoffgehalt begast und aus der Geschwindigkeit der Sulfitoxydation die Sauerstoffübergangskoeffizienten bestimmt.

In Anbetracht der Tatsache, daß die Sulfitmethode mit Kupfersulfat als Katalysator gelegentlich kritisch beurteilt wird, wurden die Versuche mehrfach wiederholt. Die Werte waren dann gut reproduzierbar, sobald unter Einhaltung sauberster Bedingungen gearbeitet wurde, worauf auch BELL und GALLO (1971) hinweisen. Schon geringe Verunreinigungen wie organische Nährstoffreste oder Spuren von Antischaummitteln hemmten die Sulfitoxydationsgeschwindigkeit erheblich, wie die folgende Tabelle zeigt:

Tab. 5 Einfluß geringer Verunreinigungen auf die Sulfitoxydationsgeschwindigkeit

Zusatz zur Sulfitlösung	$K_L a \cdot C_E$
-	254
0,05 % Cornsteep	98
0,025 % Sojamehl	108
0,005 % Pluronic L 81	105
Kolben nach Gebrauch zweimal gespült	105
-	246

Bei diesen Versuchen wurde stets derselbe Kolben verwendet, nämlich ein 2 Liter Erlenmeyerkolben mit Schikanen und 500 ml Füllung ohne Stopfen.

2. Messung des in Flüssigkeit gelösten Sauerstoffs

Nachdem die Leistungsfähigkeit der Belüftungseinrichtung gekennzeichnet ist, muß diesen Werten der Bedarf an Sauerstoff gegenübergestellt werden, den die Kultur zu verschiedenen Zeiten hat und der gedeckt werden muß. Dazu ist auf die Meßmethode an dieser Stelle im einzelnen einzugehen.

2. 1 Polarographische Sauerstoffmessung in Fermentationsmedien

In den letzten Jahren hat sich technisch die Möglichkeit ergeben, mit Hilfe von Sauerstoffelektroden, die nach galvanischem oder polarographischem

Meßprinzip arbeiten, den Partialdruck des in einer Flüssigkeit gelösten Sauerstoffs kontinuierlich zu messen. Über die Arbeitsweise sowie Vor- und Nachteile dieser Methoden ist vielfach berichtet worden, so daß darauf nicht weiter eingegangen werden muß. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß mit der Kenntnis des Sauerstoffpartialdrucks die tatsächliche Menge (in mg/l) des gelösten Sauerstoffs noch nicht bekannt ist. Bekanntlich ist die Löslichkeit des Sauerstoffs bei unterschiedlichen Probenlösungen verschieden. In einer Salzlösung nimmt z. B. die Löslichkeit des Sauerstoffs mit zunehmender Salzkonzentration ab, ohne daß eine Änderung des Partialdrucks angezeigt wird. Für den Fall, daß in reinem Wasser gemessen wird, läßt sich aus überall zugängigen Tabellen leicht ermitteln, daß z. B. bei 30° C und 760 mm Hg Luftdruck im Sättigungsfall 7,5 mg Sauerstoff in jedem Liter Wasser gelöst sind. In Fermentationslösungen sind aber von Fall zu Fall unterschiedliche Mengen von Nährsalzen, organischen Nährstoffen oder Antischaummitteln gelöst, welche die Menge des gelösten Sauerstoffs um so stärker vermindern, je höher ihre Konzentrationen sind. Nach BRONN (1967) sind in einem Liter Nährlösung üblicher Zusammensetzung beim Sauerstoffpartialdruck der Luft und 30° C nur etwa 5 mg Sauerstoff/l gelöst. Der Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffpartialdruck und der tatsächlichen Sauerstoffmenge in einer Lösung muß von Fall zu Fall ermittelt werden, wenn man Vergleiche zwischen verschieden zusammengesetzten Medien oder Medium und Ergebnissen aus manometrischen Messungen anstellen will. Im folgenden Abschnitt wird über die Erstellung von Eichkurven mit unbeimpften Nährlösungen berichtet. Nicht berücksichtigt wurden dabei Änderungen der Zusammensetzung und Konzentration der gelösten Komponenten, die sich möglicherweise während der Fermentation ergeben.

2.2 Erstellung von Eichkurven für einige Fermentationsmedien

Für folgende Medien wurde der Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck und gelöster Menge Sauerstoff in mg/l bestimmt: Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Medium 3, physiologische Kochsalzlösung + 2 % Hefeextrakt und FP-Medium + 2 % Hefeextrakt. Die Medien wurden mit Gasgemischen aus Stickstoff und Sauerstoff von unterschiedlichem Sauerstoffgehalt gesättigt, der jeweilige Partialdruck nach polarographischer Methode und der Sauerstoffgehalt nach dem im methodischen Teil beschriebenen chemischen Verfahren ermittelt. In Tabelle 6 sind die verwendeten Gasgemische aufgeführt, die Sauerstoffgehalte entstammen dem Analysenzertifikat

Tab. 6 Gasgemische und ihr Sauerstoffpartialdruck in gesättigter Lösung

Gasgemisch	Vol. % O_2	Partialdruck O_2 (mm Hg)	
		errechnet	gemessen
Luft	21	160	160
N_2/O_2	16,6	126	128
N_2/O_2	12,7	97	100
N_2/O_2	8,8	67	70
N_2/O_2	4,96	38	41
N_2/O_2	1,03	7,9	10
N_2	0	0	3

des Lieferanten MESSER GRIESHEIM GmbH. Die hieraus errechneten Partialdruckwerte liegen alle 2 - 3 mm Hg niedriger als die tatsächlich gemessenen. Diese Abweichung wurde als geringfügig angesehen und später nicht weiter berücksichtigt. Sie war vermutlich versuchsbedingt. Die Elektrode selbst arbeitete exakt. Direkt in den jeweiligen Gasstrom eingeführt, zeigte sie den errechneten Wert genau an, in sauerstoffverbrauchender Kultur

und bei unterbrochener Sauerstoffzufuhr ging die Anzeige exakt auf Null.

Die mit diesen Gasgemischen und den aufgeführten Medien erstellten Eichkurven sind in Abbildung 14 zusammengestellt.

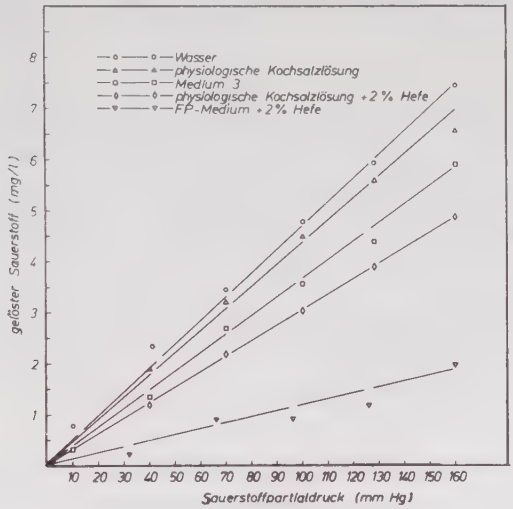


Abb. 14 Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck und mg/l gelösten Sauerstoffs bei diversen Medien

Die einzelnen Medien wurden mit Gasgemischen von unterschiedlichem Sauerstoffgehalt gesättigt. Für jeden Sättigungswert konnte dann der Partialdruck des Sauerstoffs in der Lösung polarographisch gemessen und der dazugehörige Sauerstoffgehalt in mg/l nach WINKLER (1914) bestimmt werden.

Es zeigte sich, daß die Unterschiede im Sauerstoffgehalt bei Sättigung mit den verschiedenen Gasgemischen erheblich sind. Bei hochkonzentrierten Medien, insbesondere bei FP-Medium mit Zusatz von 2 % Hefeextrakt, ist

der Endpunkt der Titration nicht mehr so scharf festzustellen, so daß die Einzelwerte, aus denen die Mittelwerte für die Eichkurven errechnet wurden, stärkeren Schwankungen unterlagen.

3. Einfluß von Antischaummittelzusätzen auf die Menge des gelösten Sauerstoffs

Den Medien mußten Antischaummittel zugesetzt werden, da sie bei Belüftung und wachsender Kultur stark schäumten. Für die Versuche wurde Pluronic L 81[1)] verwendet, ein Produkt der Firma WYANDOTTE CHEMICALS CORP., das gute Schaumbekämpfungseigenschaften besitzt und daneben als gutes Netzmittel mit geringer Wasserlöslichkeit bekannt ist. Die Einsatzmenge wurde für alle Kolben mit 30 mg/l konstant gehalten. Wohl auf Grund seiner geringen Wasserlöslichkeit ist der Einfluß von Pluronic L 81 auf die Menge des gelösten Sauerstoffs unerheblich, wie Abbildung 15 zeigt.

Bei diesen Versuchen wurde ein interessanter Effekt beobachtet, der - ohne ihn weiter verfolgen zu wollen - kurz angedeutet werden soll. CORMAN et al. (1957) untersuchten einige Antischaummittel und teilten mit, daß sich die Sauerstoffabsorptionsraten in Sulfitlösungen bei diesen Zusätzen extrem erniedrigten. Zu diesem Bericht wurde weiter vorn bereits angedeutet, daß Zusätze, u. a. Antischaummittel, den komplexen Vorgang der Sulfitoxydation hemmen und damit diese Methode für die Bestimmung der OAR ungeeignet machen. Will man dem Augenschein glauben, so müßte der Zusatz von Plur-

1) Blockmischpolymerisat mit einer hydrophoben Basiskomponente, die durch Kondensation von Propylenoxyd mit Propylenglycol erhalten wird und an deren Enden durch Addition von Äthylenoxyd hydrophile Polyoxyäthylengruppen gesetzt werden.

onic L 81 eher einen günstigen Einfluß auf die OAR haben, denn wie die beiden Bilder 5 und 6 zeigen, wurde bei gleicher Belüftungsrate unter Zusatz

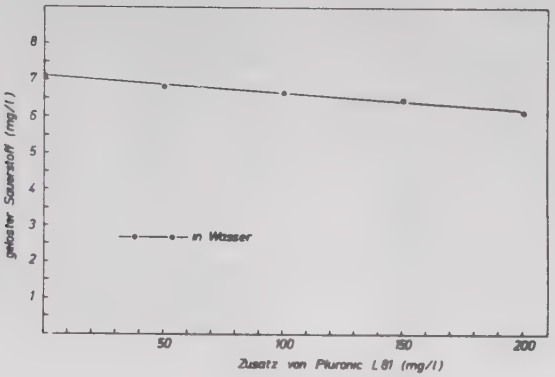


Abb. 15 Einfluß von Pluronic L 81 auf die Menge des in Wasser gelösten Sauerstoffs

von 30 mg/l des Antischaummittels die Blasengröße extrem erniedrigt, so daß das für den Gasaustausch wesentliche Verhältnis von Oberfläche zu Volumen erheblich günstiger wird. Nach CEJKA (persönliche Mitteilung) sinkt aber $K_L a$ bei Zusatz von Pluronic; man muß vermuten, daß zwar die Wirksamkeit als Netzmittel die Blasengröße verkleinert, aber auch die Grenzschicht zwischen Gas und Flüssigkeit ungünstig für die Diffusion beeinflußt. Alles in allem sollte man den Antischaummittelzusatz so niedrig wie möglich halten. Bewährt hat sich bei den Versuchen die genannte Menge, die bei der Bereitung des Mediums zugesetzt und mit sterilisiert werden kann. Da der Einfluß auf die Menge des gelösten Sauerstoffs minimal war, wurde keine Korrektur der Eichkurven vorgenommen.

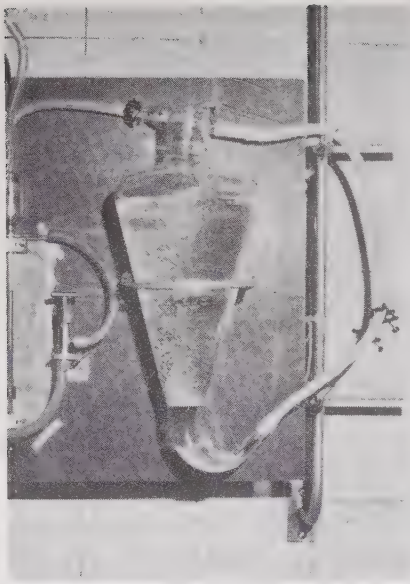


Bild 5

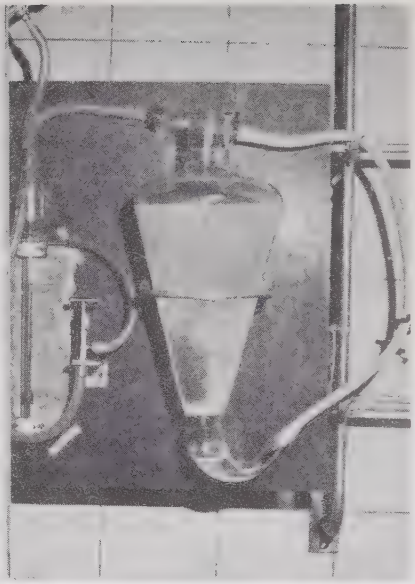


Bild 6

Größe und Verteilung der durch die Fritte eintretenden Luftblasen ohne (Bild 5) und mit (Bild 6) Zusatz von 30 mg/l des Antischaummittels Pluronic L 81

4. Anzucht der Kultur

Die Anzucht wurde in FP-Medium unter Zusatz von 2 % Hefeextrakt in Belüftungskolben durchgeführt. Dabei wurden der pH-Verlauf, das Wachstum und der Sauerstoffpartialdruck der Fermentationslösung durch Messungen verfolgt. Belüftet wurde mit 20 l/l · h entsprechend einem $K_L a \cdot C_E$ von 30,5 mmolen O_2/l · h (Abb. 16).

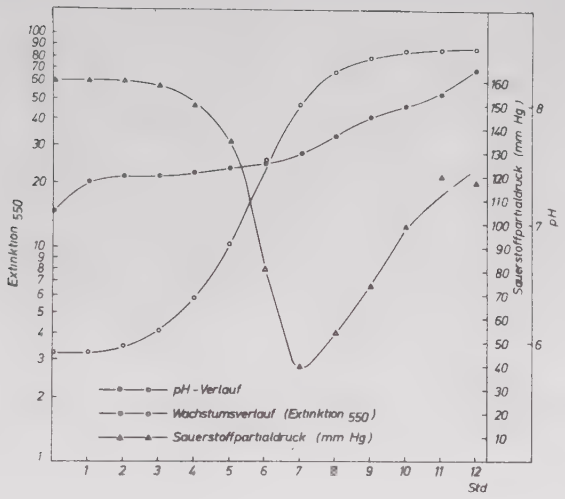


Abb. 16 Anzucht der Kultur

Verlauf von Wachstum, Sauerstoffgehalt und pH während der Anzucht in Belüftungskolben mit FP-Medium und Zusatz von 2 % Hefeextrakt. Die Temperatur betrug 30° C, die Belüftungsrate 20 l/l · h entsprechend einem $K_L a \cdot C_E$ von 30,5 mmolen O_2/l · h.

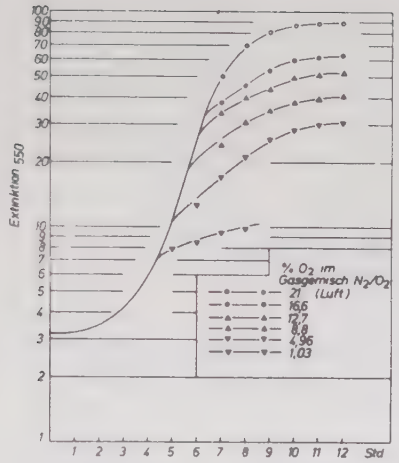
Die Wachstumskurve zeigt einen normalen Verlauf, der pH-Wert steigt langsam von 7 gegen 8,5 an, und der Sauerstoffpartialdruck fällt von 160 mm Hg gegen Ende der logarithmischen Phase auf einen Tiefstwert von 40 mm Hg, um dann in der stationären Phase wieder anzusteigen. Von besonderem Interesse ist hierbei der Tiefstwert der Sauerstoffkurve, da nach Möglichkeit vermieden werden soll, daß Sauerstoff zu irgendeinem Zeitpunkt als wachstumsbegrenzender Faktor auftritt. In FP-Medium + 2 % Hefeextrakt entsprechen 40 mm Hg nach der Eichkurve 0,5 mg O_2/l. Dies erscheint ausreichend, da Wachstumsgeschwindigkeit und Ertrag die erwarteten Werte aufwiesen.

5. Ermittlung des für die Anzucht kritischen Sauerstoffangebotes

Als kritischer Sauerstoffpartialdruck wird üblicherweise der Partialdruck bezeichnet, unterhalb dessen die Geschwindigkeit der Zellatmung gehemmt wird. Für zahlreiche Mikroorganismen ist ermittelt worden, daß die Atmungsgeschwindigkeit innerhalb eines weiten Bereiches unabhängig vom Sauerstoffgehalt des Mediums ist (BRONN, 1967). Nach BROWN (1970), der mehrere Autoren zitiert, liegen die kritischen Sauerstoffwerte einiger Mikroorganismen zwischen 5 und 25 % Sättigung bzw. 7,5 und 37,5 mm Hg, bzw. 0,26 und 2 mg O_2/l.

Während der Anzucht wurden die Belüftungskolben mit den schon beschriebenen Gasgemischen aus Stickstoff und Sauerstoff begast, wobei der Sauerstoffanteil zwischen 21 % und 1 % variierte. Der Sauerstoffpartialdruck wurde kontinuierlich gemessen und das Wachstum durch die Trübungszunahme verfolgt. Als der für dieses Wachstum kritische Sauerstoffpartialdruck soll derjenige Verlauf oder Einzelwert gelten, bei dem die Wachstumsgeschwindigkeit ein vom normalen Verlauf abweichendes Verhalten zeigt. Als normal wird der unter III.4. dargestellte Wachstumsverlauf angesehen, der als Kurve für 21 % O_2 in die Abbildungen 17 und 18 mit aufgenommen wurde.

Die Kurvenverläufe geben klare Hinweise, daß Partialdrücke um 20 mm Hg über mehrere Stunden (entsprechend der Eichkurve in Abb. 14: —▽— ▽— 0,2 bis 0,3 mg O_2/l) das Wachstum in der Endphase behindern. Die Wachstumshemmung trat um so frühzeitiger ein, je weiter der Partialdruck erniedrigt wurde. Der zeitliche Zusammenhang zwischen dem Beginn der Hemmung und der Größe der Zellmasse ist offensichtlich. Um optimale Bedingungen für das Wachstum zu haben, muß deshalb dafür Sorge getragen werden, daß der Sauerstoffpartialdruck nicht über längere Zeit erheblich unter 40 mm Hg abfällt (etwa 0,5 mg O_2/l) oder, wenn das nicht möglich sein sollte, die Nährstoffkonzentration - z.B. die Hefeextraktmenge - zu erniedrigen, um



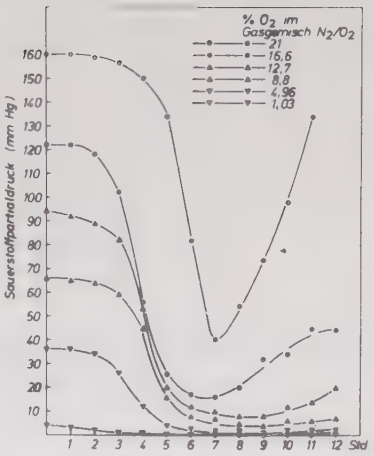


Abb. 17 Abb. 18

Wachstumsverläufe (Abb. 17) und Änderung der Sauerstoffpartialdrücke (Abb. 18) bei Belüftung mit N_2/O_2-Gasgemischen von unterschiedlichem Sauerstoffgehalt

In 5 Liter Belüftungskolben wurden jeweils 3 Liter FP-Medium unter Zusatz von 2 % Hefeextrakt mit 1 % einer 12 Stunden alten Anzuchtkultur beimpft, mit 20 l/l · h des jeweiligen Gasgemisches belüftet und der Wachstumsverlauf durch Trübungsmessungen ermittelt. Die Sauerstoffpartialdrücke wurden polarographisch mit der Sauerstoffelektrode gemessen.

die Zellmasse nicht zu hoch ansteigen zu lassen. Die Werte 40 mm Hg bzw. 0,5 mg O_2/l sind für dieses Wachstum als kritische Sauerstoffwerte anzusehen. Das bedeutet nach der Eichkurve in Abb. 13 auch, daß ein $K_L a \cdot C_E$ von 25 für die Zeit des höchsten Sauerstoffverbrauchs nicht mehr ausreichend ist. Dieser Punkt ist bei einer Trübung von ca. Extinktion$_{550}$: 35 erreicht, was einer Trockenmasse von etwa 1 g/l entspricht, wie die Eichkurve in Abb. 19 anzeigt.

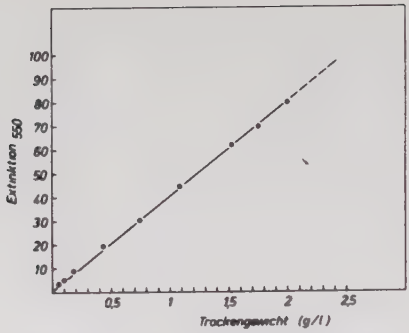


Abb. 19 Zusammenhang zwischen den als Extinktion$_{550}$ gemessenen Trübungswerten und dem Trockengewicht in g/l

6. Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur

Die Versuche wurden in einer temperierbaren Rotationsschüttelmaschine durchgeführt. Die Anzucht erfolgte in 2 Liter Erlenmeyerkolben mit 500 ml Füllung FP-Medium bei Temperaturen zwischen 30 und 45° C.

Aus der Abbildung 20 geht hervor, daß die optimale Wachstumstemperatur 38° C beträgt, hier liegt die Verdopplungszeit bei 35 Minuten.

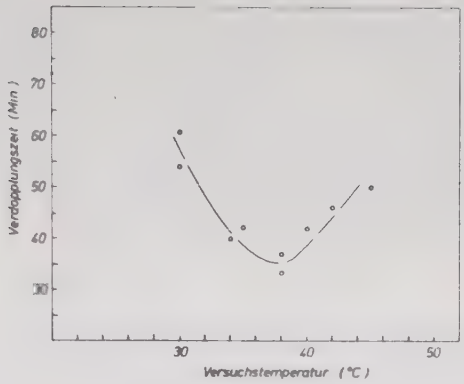


Abb. 20 Abhängigkeit der Verdopplungszeit von der Wachstumstemperatur

Die Wachstumsverläufe wurden in FP-Medium (0,1 % Hefeextraktzusatz) durch Trübungsmessungen verfolgt, nachdem aus einer Anzuchtkultur mit jeweils 1 % beimpft worden war. Die verschiedenen Versuchstemperaturen konnten in einer temperierbaren Schüttelbox eingestellt werden.

7. Sauerstoffbedarf der Kultur in stationärer Phase

Im Hinblick auf die noch zu besprechende Umwandlung von Steroiden ist auch der Sauerstoffbedarf der Kultur in stationärer Phase von Interesse.

7.1 Manometrische Messung des Sauerstoffverbrauchs

Die in FP-Medium mit 2 % Hefeextrakt angezogene Kultur wurde zur beginnenden stationären Phase (10. Std.) geerntet und durch Zentrifugieren und

wiederholtes Aufnehmen in Phosphatpuffer von den noch vorhandenen Nährstoffen getrennt. Zellmengen, die etwa 0,4 bis 6,5 g Trockenmasse pro Liter entsprachen, wurden in die Gefäße eingefüllt und ihr Sauerstoffbedarf nach Zusatz von frischem FP-Medium mit 2 % Hefeextrakt ermittelt. Ohne Zusatz von frischer Nährlösung hatte die Kultur keinen nennenswerten Sauerstoffverbrauch (30 µl O_2/h · gTG, entsprechend 43 µg O_2/l), nach Zusatz trat starker Bedarf auf, der um so höher lag, je größer die Zellmenge im Gefäß war.

Aus Abbildung 21 geht hervor, daß der Sauerstoffverbrauch bis zu einer Bakteriendichte von 2 g/l linear mit der Zellmasse ansteigt, ihr Bedarf an Sauerstoff beträgt also 290 ml O_2/h oder 13 mmole O_2/h oder auf 1 g Trokkenmasse/l bezogen 145 ml O_2/h bzw. 6,5 mmole O_2/h. Im Vergleich zu den Höchstwerten der Wachstumsphase (über 25 mmole O_2/l · h) hat sich der Bedarf in der stationären Phase also erheblich vermindert.

Ähnliche Ergebnisse (Abb. 22) wurden nach Zusatz von Caseinhydrolysat ermittelt, nämlich als Grenzwert 240 ml O_2/h für 2,5 g/l oder 96 ml O_2/h bzw. 4,3 mmole O_2/h für 1 g Zellmasse pro Liter.

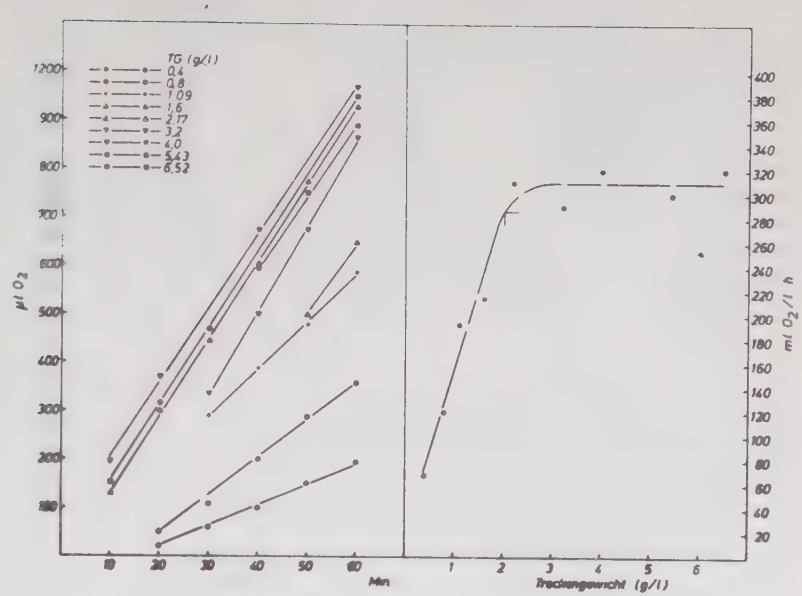


Abb. 21 Manometrische Bestimmungen des Sauerstoffverbrauchs verschiedener Bakteriendichten nach Zusatz von frischem FP-Medium mit 2 % Hefeextrakt

Die Bakterien waren in FP-Medium (2 % Hefeextrakt) angezogen. Aus der beginnenden stationären Phase (10. Std.) wurden sie geerntet, zweimal in Phosphatpuffer gewaschen und dann in Phosphatpuffer aufgenommen. Zellmassen zwischen 0,4 und 6,5 g TG/l wurden in die Haupträume der Warburg-Gefäße eingefüllt, je ein Seitenarm enthielt 0,5 ml frische Nährlösung und der Zentralzylinder 0,2 ml 2 N KOH. Je nach Bedarf wurde das Versuchsvolumen aus dem zweiten Seitenarm mit Phosphatpuffer auf 3 ml aufgefüllt. Nach einstündigem Schütteln bei offenen Hähnen wurden die Versuche durch Zusammenkippen der Flüssigkeiten und Schließen der Hähne gestartet.

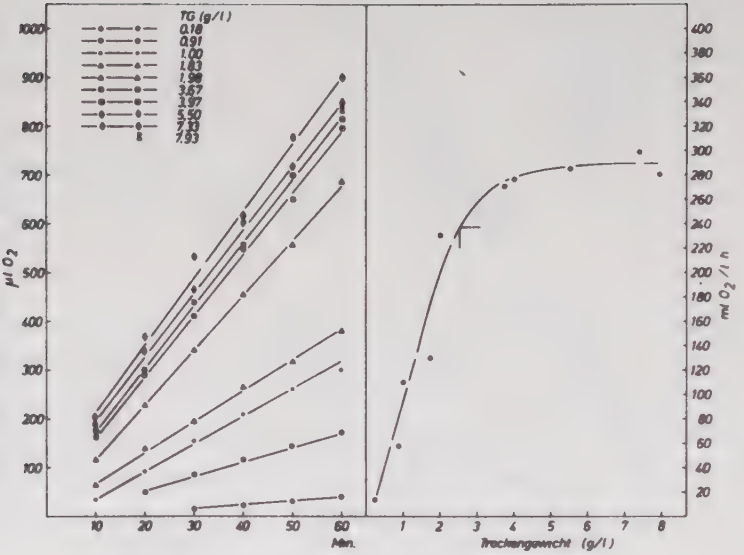


Abb. 22 Manometrische Bestimmungen des Sauerstoffverbrauchs verschiedener Bakteriendichten nach Zusatz von frischem Caseinhydrolysat

Die Versuche wurden so durchgeführt wie für Abb. 21 beschrieben. Die Zellkonzentrationen schwankten zwischen 0,18 und 7,93 g TG/l.

7.2 Messung des Sauerstoffverbrauchs der Submerskultur

Aus Gründen, die später noch zu erläutern sein werden, ist geplant, die Versuche zur Steroidumwandlung in einem Zeitraum von 3 Stunden durchzuführen, beginnend mit der 10. Stunde nach der Beimpfung. Um dabei störende Nebenwirkungen auszuschalten, soll die Kultur zentrifugiert und nach mehrmaligem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen werden. Für diesen physiologischen Zustand werden hier die O_2-Konsumptionsraten mit und ohne Hefeextraktzusatz angegeben.

Die Konsumptionsrate war von der Zelldichte abhängig und nach Zusatz von Hefeextrakt erheblich höher als ohne. Sie hatte über den Versuchszeitraum abnehmende Tendenz, angegeben ist eine mittlere Rate 1 1/2 Stunden nach Versuchsbeginn. Eine einfache Rechnung soll den Sauerstoffbedarf kennzeichnen. 2 g/l Trockenmasse (die später stets angestrebte Versuchsmenge) hat folgende Konsumptionsraten, einmal mit Hefeextrakt: 30 mm Hg/min, das sind nach der Eichkurve in Abbildung 14 (—◇——◇—) etwa 1 mg O_2/l · min bzw. 60 mg O_2/l · h oder knapp 2 mmole O_2/l · h, zum anderen ohne Hefeextrakt: 8 mm Hg/min, das sind nach derselben Eichkurve 0,25 mg O_2/l · min bzw. 15 mg O_2/l · h oder etwa 0,5 mmole O_2/l · h. Der letztgenannte Wert, der als extrem niedrig anzusehen ist, erhält besondere Bedeutung bei der Ermittlung der kritischen Sauerstoffkonzentration für die Steroiddehydrogenierung. Da sich die O_2-Konsumptionsrate kurzfristig ändert, soll zur Charakterisierung des Zustandes der Kultur im eingangs genannten Versuchszeitraum der Sauerstoff-Absorptionskoeffizient $K_L a$ bestimmt werden.

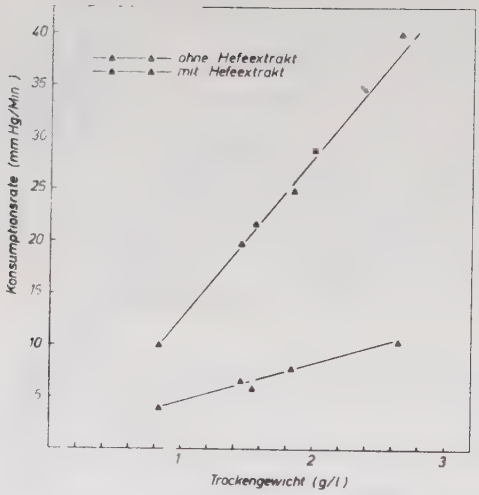


Abb. 23 O_2-Konsumptionsraten verschiedener Bakteriendichten mit und ohne Hefeextraktzusatz

Nach Anzucht in FP-Medium (2 % Hefeextraktzusatz) wurden 2 bis 6 Liter der 10 Stunden alten Kultur zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, nach Aufnehmen in 3 Litern physiologischer Kochsalzlösung und Einfüllen in 5 Liter Belüftungskolben wurde die Suspension mit 20 l/l · h Luft begast. Wenn die Zuluft unterbrochen wurde, konnte mit Hilfe der polarographischen Sauerstoffelektrode der Sauerstoffverbrauch durch die Geschwindigkeit der Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks in der Suspension ermittelt werden.

7.3 Bestimmung von $K_L a$ im geplanten Versuchszeitraum nach der dynamischen Methode (TAGUCHI und HUMPHREY, 1966)

Bei dieser Bestimmung ging es nicht darum, einen Vergleich mit der nach der Sulfitmethode ermittelten OAR anzustellen; deren Bedeutung liegt in der Charakterisierung der apparativen Möglichkeiten und beinhaltet, daß die Menge des gelösten Sauerstoffs gegen Null geht. Vielmehr sollte festgestellt werden, ob und wie sich der physiologische Zustand der Kultur in dem für die Steroiddehydrogenierung vorgesehenen Versuchszeitraum ändert. Die 10 Stunden alte Kultur wurde nach Zentrifugieren, mehrmaligem Waschen und Aufnehmen in physiologischer Kochsalzlösung nach dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren bearbeitet (Belüftung: 20 l/l · h).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 wiedergegeben. Danach ändert sich der Absorptionskoeffizient im vorgesehenen Versuchszeitraum nur unwesentlich. Dies ist einer der Gründe, die nachfolgend zu beschreibenden Dehydrogenierungsversuche in dieser Phase durchzuführen.

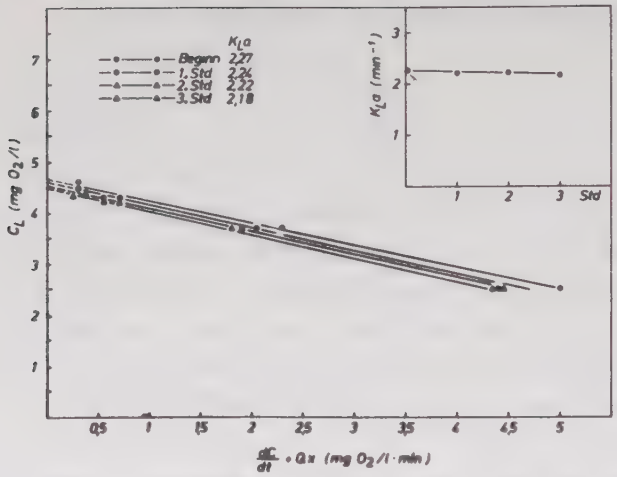


Abb. 24 Änderung von $K_L a$ in den ersten drei Stunden der stationären Phase

Diese Versuche wurden wieder mit einer zweimal gewaschenen und in 3 Litern physiologischer Kochsalzlösung aufgenommenen Kultur aus der stationären Phase in 5 Liter Belüftungskolben durchgeführt. Die für die Berechnung nach der im methodischen Teil beschriebenen dynamischen Methode erforderlichen Werte ergaben sich nach Abstellen und Einschalten der Zuluft durch die mit der polarographischen Sauerstoffelektrode gemessenen Geschwindigkeiten der Ab- und Zunahme des Sauerstoffpartialdrucks.

D. Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon

Nachdem an einigem Stellen dieses Berichtes schon kurz auf die Fähigkeit der Kultur hingewiesen wurde, an bestimmten Steroiden eine Δ^1-Dehydrogenierung vornehmen zu können, sollen die Bedingungen, unter denen diese Reaktion abläuft, jetzt im einzelnen untersucht werden.

I. Einführende Darstellung

1. Geschichtlicher Überblick über die mikrobielle Δ^1-Dehydrogenierung von Steroiden

Nachdem u. a. HERZOG (1955) über den therapeutischen Wert von Steroiden berichtet hatte, die durch Δ^1-Dehydrogenierung von Δ^4-3-Ketosteroiden entstanden waren, begann die Suche nach Mikroorganismen, die in der Lage waren, Δ^1-Dehydrogenasen zu bilden. Nach und nach wurden eine ganze Reihe von Bakterien und Pilzen gefunden, die oft neben anderen Aktivitäten mehr oder weniger starke Δ^1-Dehydrogenaseaktivität aufwiesen.

Die ersten Dehydrogenierungen wurden von FRIED et al. (1953) sowie von VISCHER und WETTSTEIN (1953) entdeckt. Von VISCHER et al. (1955) sowie von WETTSTEIN (1955) wurden Formulierungen des Stoffwechselweges für diese Reaktion vorgeschlagen. Nach Untersuchungen mit einem dehydrogenierenden Enzymgemisch, isoliert von Pseudomonas testosteroni, kamen LEVY und TALALEY (1959) zu dem Ergebnis, daß eine direkte Dehydrogenierung und keine gemischtfunktionelle Hydroxylierung zu vermuten sei. Die Begründung war, daß die in vitro Dehydrogenierungsreaktion keinen Sauerstoff erforderte, wohingegen der enzymatische Hydroxylierungsprozeß bei Steroiden sich als sauerstoffbedürftig erwiesen hatte. Die Autoren zeigten ebenfalls, daß Phenazinmethosulfat ein leistungsfähiges

oxydierendes Agens für Δ^4-3-Ketosteroide ist, wenn es unter anaeroben Bedingungen mit einem Enzympräparat von P. testosteroni wirkt. Nicht effektiv waren NAD^+, $NADP^+$, Riboflavinmonophosphat, FAD und Cytochrom C.

Es sollte aber nicht gefolgert werden, daß eine in vivo Transformation anaerob mit P. testosteroni ohne Abfall der Effektivität ablaufen kann, da nicht anzunehmen ist, daß die oxydierenden Agenzien in stöchiometrischen Mengen vorliegen. Somit wäre Sauerstoff erforderlich, um das natürliche Äquivalent des Phenazinmethosulfats zu regenerieren.

Dieser Ablauf der Dehydrogenierung wurde auch von GALE et al. (1962) bestätigt. Sie wiesen bei Bacillus sphaericus ein Chinon nach, das von ihnen als Vitamin K_2 identifiziert wurde und das essentiell für die Dehydrogenierung von Hydrocortison zu Prednisolon war. In einem zellfreien Extrakt von B. sphaericus wurde durch Fotoinaktivierung des Vitamins K_2 die Dehydrogenierungsaktivität zerstört. Das System konnte dann durch Zusatz von Vitamin K_2 oder verwandten Stoffen (z. B. Menadion) vollständig regeneriert werden. GALE und Mitarbeiter schlossen daraus, daß Vitamin K_2 der Cofaktor für die Dehydrogenierung mit B. sphaericus war.

HAYANO et al. (1961), RINGOLD et al. (1963) sowie JERUSSI und RINGOLD (1965) schlugen einen Reaktionsmechanismus vor, bei dem er erste Schritt eine enzymatische Enolisierung der 3-Keto- gegen die 2-Position ist. Hierauf soll die Übertragung des α-Wasserstoffs der 1-Position auf das Coenzym mit anschließendem Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes folgen.

2. Modellversuch einer Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon

$C_{21}H_{30}O_5$, Hydrocortison
(Δ^4 - Pregnen - 11β,17,21 - triol - 3,20 - dion)
M 362,47

$C_{21}H_{28}O_5$, Prednisolon
($\Delta^{1,4}$ - Pregnadien - 11β,17,21-triol - 3,20-dion)
M 360,46

Abb. 25 Δ^1-Dehydrogenierung von Hydrocortison zu Prednisolon mit dem Testorganismus

Diese einleitenden Versuche wurden in Schüttelkolben (500 ml mit 100 ml Füllung) in FP-Medium durchgeführt; der Hydrocortisoneinsatz betrug 545 mg/l gelöst in 31 ml Methanol; die Zugabe erfolgte zur zweiten Stunde, nachdem der Fermentationskolben mit 10 % Inoculum aus einem Anzuchtkolben beimpft worden war; die Analysenwerte wurden durch Dünnschichtchromatographie ermittelt. In Abbildung 26 ist der Umsetzungsverlauf dargestellt; die Analysenpunkte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Die Umwandlung verlief quantitativ ohne Bildung nennenswerter Nebenzonen. Als Ausgangsmaterial ebenfalls geeignet ist das 17-Acetat des Hydrocortisons (MAF) oder ein Gemisch der freien Verbindung mit diesem Acetat.

Die Reaktion war an die Anwesenheit der Zellen gebunden. Im zellfreien Filtrat der Fermentationssuspension war eine Δ^1-Dehydrogenierung nicht möglich (Abb. 27). Nach Zerstören der Zellen in einer Zellmühle blieb die

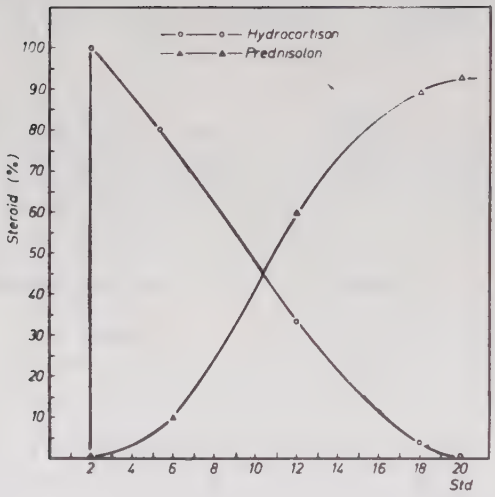


Abb. 26 Umsetzungsverlauf von Hydrocortison zu Prednisolon

500 ml Schüttelkolben mit 100 ml FP-Medium (Rotationsschüttler 175 U/Min., 30° C) wurden mit 10 % einer Anzuchtsuspension beimpft und 545 mg Hydrocortison/l gelöst in 31 ml Methanol zur zweiten Stunde zugegeben. Für die dünnschichtchromatographische Auswertung zur 6., 12., 18. und 20. Stunde wurden jeweils 10 ml entnommen.

Dehydrogenaseaktivität im Homogenat erhalten. Der Rohextrakt, der nach 20minütigem Zentrifugieren bei 6 000 U/Min. erhalten wurde, war ebenfalls zur Δ^1-Dehydrogenierung befähigt.

Die mikrobielle Bindung von Steroiden, die unter Umständen auf die Analytik von Einfluß sein könnte, wurde untersucht. Nach HARTMAN und HOLMLUND (1962) ist diese Eigenschaft bei Bakterien, Pilzen und Actinomyceten weit verbreitet. Sie verwendeten Substanzen mit langer Seitenkette wie Sitosterin und Cholesterin, die starke Bindung an Penicillium canescens zeigten und andere, ohne längere Seitenkette, wie Hydrocortison und Testosteron,

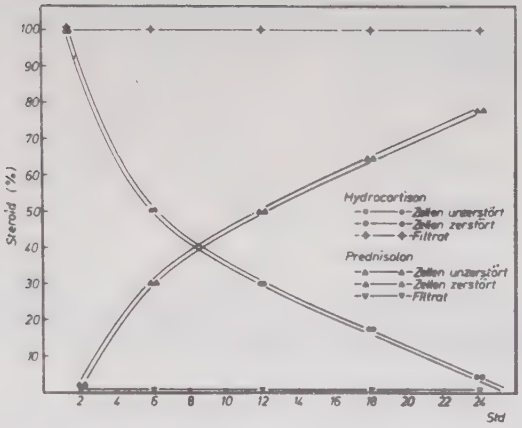


Abb. 27 Δ^1-Dehydrogenierungsaktivität der Zellen und des Filtrates

Nach Anzucht in FP-Medium (0,1 % Hefeextrakt) wurden die Zellen zur 10. Stunde geerntet (300 ml Suspension). Nach Abtrennen der Nährstoffreste durch Zentrifugieren und Waschen wurde die Hälfte der Zellmasse in einer Zellmühle zerstört und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Intakte Zellen, Filtrat und zerstörte Zellen wurden mit je 500 mg F/l versetzt und dünnschichtchromatographisch auf Umwandlung zu Prednisolon untersucht.

die nicht in nennenswertem Maße gebunden wurden.

Nach Beendigung der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon wurde das Endprodukt Prednisolon zweimal mit Methylisobutylketon extrahiert, die Zellen dann in einer Zellmühle aufgeschlossen und versucht, aus diesem Homogenat weiteres Steroid zu extrahieren. Dies gelang nicht, und es ist anzunehmen, daß in diesem Fall keine nennenswerte Steroidbindung gegeben ist, zumal auch bei einer Bilanzierung während der Fermentation kein erkennbarer Substanzverlust eintrat.

Ausgehend von diesen Kenntnissen wurden eine Reihe von Versuchen durchgeführt, um einige Umwandlungsparameter zu optimieren.

II. Optimierung von Δ^1-Dehydrogenierungsparametern bei der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon mit dem Testorganismus

Der Großteil der Versuche wurde in der im methodischen Teil beschriebenen Versuchsanlage durchgeführt. Die Steroidanalytik erfolgte durch Papierchromatographie.

1. Optimierung des Zeitpunktes der Substratzugabe

In einer Serie von Versuchen mit synthetischem Medium wurde so verfahren, daß die Zellen zur 3., 5., 7. und 9. Stunde der Anzucht geerntet wurden. Nach Zentrifugieren, Waschen und Aufnehmen in physiologischer Kochsalzlösung wurden zu gleichen Zellmengen gleiche Mengen Hydrocortison gegeben und der Verlauf der Dehydrogenierung analytisch verfolgt.

Die in Abbildung 28 graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen an, daß die Δ^1-Dehydrogenaseaktivität erst nach Abschluß der Vermehrungsphase am höchsten ist.

In weiteren Versuchen wurde der in physiologischer Kochsalzlösung befindlichen Kultur in stündlichen Abständen je 0,5 % Hefeextrakt zugesetzt und alle 20 Minuten der Fortgang der Umwandlung von Hydrocortison analytisch

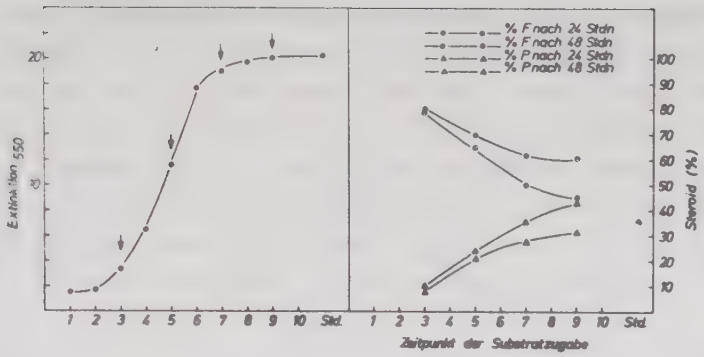


Abb. 28 Bildungsgeschwindigkeit von Prednisolon in Abhängigkeit vom Alter der Kultur

Zu den durch Pfeile gekennzeichneten Zeiten wurden die in synthetischem Medium angezogenen Zellen gewaschen und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Gleichen Zellmassen von etwa 0,5 g TG/l wurden gleiche Mengen F (50 mg/l) zugesetzt und das Verschwinden des Einsatzmaterials sowie die Bildungsgeschwindigkeit des Prednisolons in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Kultur analysiert.

verfolgt. Es ergab sich, daß nach jedem Zusatz starke Atmung und erneutes Wachstum einsetzen und in fast allen Fällen eine Hemmung, meist ein Stillstand der Reaktion, eintrat, um später die alte Geschwindigkeit wieder zu erreichen.

Alle aufgeführten Faktoren lassen es als günstig erscheinen, die in FP-Medium (+ 2 % Hefeextrakt) 10 Stunden gewachsene Kultur in physiologische Kochsalzlösung zu übernehmen und dann direkt Steroid zuzusetzen.

Die Wahl des Zeitpunktes der Substratzugabe ist aus verschiedenen Gründen einer Überlegung wert. Zum einen wird man in der Praxis schon aus

Gründen der Sterilhaltung darauf zu achten haben, daß durch die Anzucht möglichst wenig Fermentationszeit ungenutzt verstreicht, und man wird die Substratzugabe möglichst frühzeitig durchführen wollen. Zum anderen muß aber bedacht werden, daß eine zu zeitige Substratzugabe aus mehreren Gründen problematisch sein kann. Einmal besteht die Möglichkeit, daß die zuzugebenden Fremdstoffe, nämlich Steroid und Lösungsmittel, hemmend auf die Entwicklung der Kultur einwirken. Sodann ist zu berücksichtigen, daß den zitierten Arbeiten nach eine gewisse Menge Sauerstoff für die Δ^1-Dehydrogenierung erforderlich ist. Es wäre also möglicherweise nicht günstig, den Beginn der Dehydrogenierung in den Bereich des maximalen Sauerstoffbedarfs der wachsenden Kultur zu legen. Nach den obigen Ergebnissen und auch nach CEJKA (1970) läuft die Dehydrogenierung nur nach Erreichen des Maximums der Wachstums- und Sauerstoffverbrauchsraten ab.

2. Bestimmung des für die Δ^1-Dehydrogenierung optimalen pH-Bereichs

In den bisherigen Versuchen wurde der pH-Verlauf zwar messend verfolgt, nicht aber in irgendeiner Form beeinflußt. Bei der Mediumbereitung wurde stets ein pH-Wert von 7,0 eingestellt, der sich im Verlauf des Wachstums und der Steroidumwandlung ziemlich gleichmäßig auf etwa 8,5 bis 9 erhöhte. Für den Fall, daß die Δ^1-Dehydrogenase ein eng begrenztes pH-Optimum besäße, sollte dieses durch Einstellen von Werten zwischen 5 und 10 direkt vor Substratzugabe und Konstanthalten während der Dehydrogenierung ermittelt werden. Die Kultur wurde nach bekannter Vorbehandlung in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, die Substratbelastung betrug 180 mg F/l, die Versuchsdauer 3 Stunden, die Belüftung 20 l/l · h, Bedingungen, für die bereits weiter vorn nahezu konstantes $K_L a$ ermittelt worden war.

Aus Abbildung 29 ist zu ersehen, daß die höchste Prednisolonbildungsgeschwindigkeit bei 30 mg/h pro Gramm Trockenmasse lag und bei pH-Werten

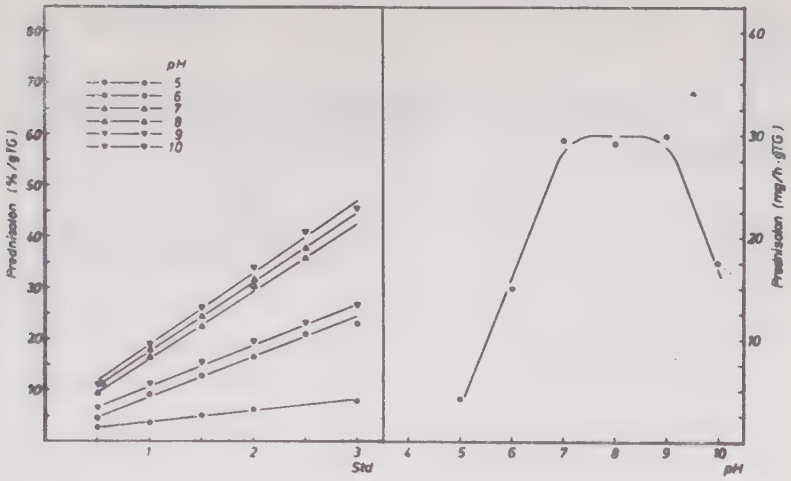


Abb. 29 Bildungsgeschwindigkeit von Prednisolon in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die in FP-Medium (2 % Hefeextrakt) angezogene Kultur wurde zur 10. Stunde geerntet, zweimal gewaschen und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Jeweils 3 Liter mit einer Zellkonzentration von etwa 2 g TG/l wurden in 5 Liter Belüftungskolben eingefüllt (Belüftung 20 l/l · h), die pH-Werte auf 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 eingestellt und über den Versuchszeitraum von 3 Stunden durch Zugabe von NaOH oder H_2SO_4 konstant gehalten. Nach Zusatz von 180 mg F/l konnte die Prednisolonbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert papierchromatographisch ermittelt werden.

zwischen 7 und 9 erreicht wurde. Unter 7 und über 9 war ein schnelles Absinken der Rate zu verzeichnen. Hieraus ergibt sich, daß eine spezielle

pH-Regulierung nicht erforderlich ist, da die Umwandlung auch ohne äußeren Eingriff in einem optimalen Bereich abläuft.

3. Bestimmung des für die Δ^1-Dehydrogenierung optimalen Temperaturbereiches

Nachdem die Temperatur für die höchste Wachstumsgeschwindigkeit mit 38° C ermittelt worden war, sollte der für die Prednisolonbildungsgeschwindigkeit optimale Temperaturbereich bestimmt werden. Aus apparativen Gründen wurden diese Versuche in 2 Liter Erlenmeyerkolben in einer temperierten Schüttelmaschine durchgeführt; dabei wurden die Bildungsgeschwindigkeiten bei 25, 30, 35, 40 und 45° C miteinander verglichen. Es ergab sich (Abb. 30), daß diese Geschwindigkeit zwischen 30 und 35° C mit 30 mg/h · g TG am höchsten war, unter 30° C steil absank, über 35° C zunächst langsam zurückging, um dann bei über 40° C steil abzufallen, bei 45° C war die Produktbildungsgeschwindigkeit nahezu Null.

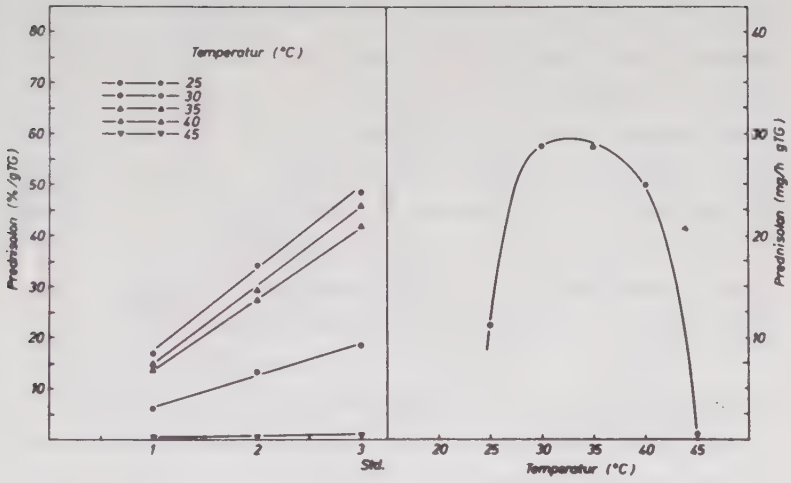


Abb. 30 Bildungsgeschwindigkeit von Prednisolon in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Versuchssuspension wurde, wie in Abb. 29 beschrieben, vorbereitet, je 500 ml in 2 Liter Erlenmeyerkolben eingefüllt, 180 mg F/l zugesetzt und bei 25, 30, 35, 40 und 45° C geschüttelt. Die Bildungsgeschwindigkeit von Prednisolon in Abhängigkeit von der Temperatur ließ sich wieder papierchromatographisch bestimmen.

4. Bestimmung des für die Δ^1-Dehydrogenierung kritischen Sauerstoffpartialdrucks

Wenn für die Δ^1-Dehydrogenierung Sauerstoff erforderlich ist, so wird es möglicherweise auch hierfür eine kritische Sauerstoffkonzentration geben, unterhalb derer sich die Prednisolonbildungsgeschwindigkeit verlangsamt. Um sie zu ermitteln, wurde eine Versuchsreihe in folgender Weise durchge-

führt. Wie schon einmal beschrieben, wurde die Kultur nach Anzucht in FP-Medium (+ 2 % Hefeextrakt) in der beginnenden stationären Phase geerntet und nach Zentrifugieren und Waschen in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Suspensionen, die dann etwa 2 g Trockenmasse/l enthielten, wurden mit den an anderer Stelle schon verwendeten Gasgemischen unterschiedlichen Sauerstoffgehaltes begast (20 l/l · h), so daß sich definierte Partialdrücke in den Lösungen einstellen konnten, die mit der Sauerstoffelektrode kontinuierlich gemessen wurden. Dazu wurden, in Methanol gelöst, 180 mg F/l zugesetzt; die Versuchsdauer betrug wieder 3 Stunden; die Probenentnahme für die Papierchromatographie erfolgte halbstündlich zur Bestimmung der Prednisolonbildungsgeschwindigkeit.

Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 31 graphisch zusammengestellt und wie folgt zu beschreiben: Für die genannten Versuchsbedingungen lag die optimale Prednisolonbildungsgeschwindigkeit bei 30 mg/h · gTG. Sie änderte sich in einem Partialdruckbereich von 160 bis 50 mm Hg nicht. Von etwa 50 mm Hg abwärts begann die Geschwindigkeit erst langsam und dann steil abzufallen. Nach Abbildung 14 (—Δ—Δ—) entsprechen 50 mm Hg etwa 2,2 mg O_2/l in der Lösung. Diese Größen werden als die für die Prednisolonbildung kritischen Sauerstoffwerte angesehen. Die Sauerstoffmenge, die tatsächlich verbraucht wird, muß aber sehr niedrig sein, da sich der O_2-Partialdruck des jeweiligen Gasgemisches auch in gleicher Höhe spontan in der Suspension einstellte und nicht irgendein Gleichgewicht zwischen Null und dem O_2-Partialdruck des Gasgemisches, was der Fall sein müßte, wenn bei der Δ^1-Dehydrogenierung größerer Verbrauch vorläge.

Die Kenntnis des Sauerstoffeinflusses erlaubt jetzt, die Frage nach einer Steigerung der Prednisolonbildungsgeschwindigkeit anzugehen.

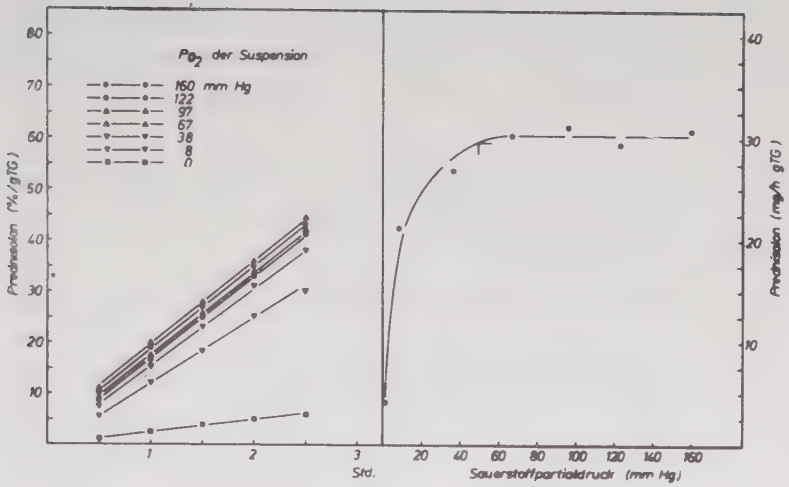


Abb. 31 Bildungsgeschwindigkeit von Prednisolon in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck der Suspension

Die Versuchssuspensionen wurden wie in Abb. 29 in Belüftungskolben vorbereitet. Zur Belüftung standen N_2/O_2-Gemische mit unterschiedlichem Sauerstoffgehalt bei konstanter Durchflußrate (20 l/l · h) zur Verfügung. Zur Partialdruckmessung diente eine polarographische Sauerstoffelektrode. Nach Zusatz von 180 mg F/l wurde die Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit des Prednisolons vom Sauerstoffpartialdruck der Suspension untersucht.

5. Versuche zur Steigerung der Δ^1-Dehydrogenierungsaktivität

Bei diesen Versuchen -durchgeführt wie schon unter II. 4. beschrieben, jedoch nur belüftet mit Luft - sollte der Einfluß der Zellmasse auf die Prednisolonbildungsrate bestimmt werden.

Es zeigte sich, daß mit einer Steigerung der Zellmasse bis auf etwa 3,8 g/l ein linearer Anstieg der Prednisolonbildungsgeschwindigkeit bis auf etwa 115 mg/h einherging (Abb. 32).

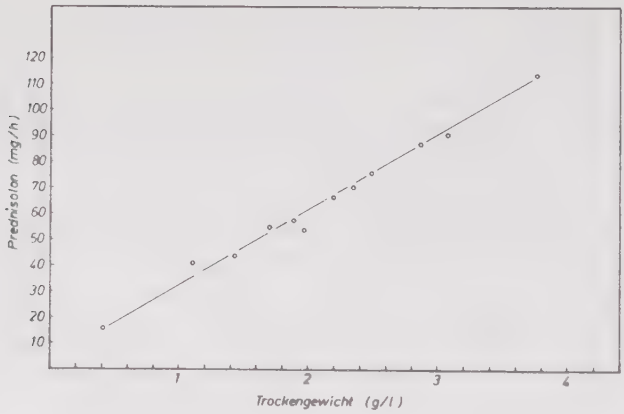


Abb. 32 Steigerung der Prednisolonbildungsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Zellzahl

Die Versuchssuspensionen wurden wieder wie für Abb. 29 vorbereitet. Um die Abhängigkeit der Prednisolonbildungsgeschwindigkeit von der Zelldichte zu bestimmen, wurden die Zellkonzentrationen zwischen 0,4 und 3,8 g TG/l variiert. Die Belüftung betrug 20 l/l · h, die Substratbelastung 180 mg F/l, die Analytik erfolgte papierchromatographisch.

Nun lassen sich Zelldichten nicht beliebig steigern, einmal aus apparativen Gründen, zum anderen, weil das umgewandelte Produkt möglichst quantitativ extrahiert werden muß, wobei ein hoher Anteil an Zellen erheblich stören kann. Deshalb war auch zu prüfen, ob sich die Steroidbelastung bei konstanter Bakteriendichte steigern läßt.

6. Versuche zur Steigerung der Einsatzmenge von Hydrocortison

Versuchsanordnung und Versuchsdurchführung blieben unverändert, der Hydrocortisoneinsatz wurde zwischen 40 mg/l und 3 g/l variiert; bei den höchsten Substratkonzentrationen mußte die Versuchsdauer auf 6 Stunden verlängert werden.

Wie in Abbildung 33 dargestellt, stieg zunächst die Prednisolonbildungsgeschwindigkeit an, bis sie bei einer Belastung von 150 mg F/l ihren Höchstwert mit 30 mg/h · gTG erreichte. Diese Geschwindigkeit [illegible] zu einer Belastung von 2 g F/l konstant, bei 3 g F/l erreichte sie nur noch die Hälfte des optimalen Wertes. Neben dieser Substrathemmung dürfte auch die Lösungsmittelmenge, die bei 3 g F/l 8 % der Fermentationslösung überschwemmt, eine wesentliche Rolle spielen.

Wenn auch bei einer Belastung von 2 g F/l die Prednisolonbildung mit Höchstgeschwindigkeit abläuft, so sollte man doch nicht ohne weiteres erwarten, daß die Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon auch insgesamt quantitativ verläuft. Nach CHEN et al. (1965) muß für die Δ^1-Dehydrogenierung das Steroid in Lösung vorliegen, wobei die Anwesenheit des einen Steroids die Löslichkeit des anderen behindern kann, was wegen der ähnlichen Molekülstruktur auch zu erwarten wäre. Sodann wiesen CHEN et al. (1962)

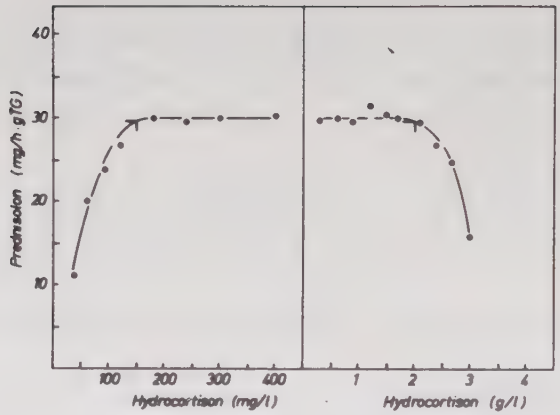


Abb. 33 Änderung der Prednisolonbildungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Einsatzmengen von Hydrocortison

Zu den wie in Abb. 29 vorbereiteten Belüftungskolben wurden Hydrocortisonmengen zwischen 40 mg/l und 3 g/l zugesetzt und papierchromatisch die Prednisolonbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Einsatzmenge bestimmt.

nach, daß es sich bei der Δ^1-Dehydrogenierung um eine Reaktion 1. Ordnung mit Hemmung durch das Endprodukt handelte.

Gerade diese Hinweise legen es nahe, in einer letzten Versuchsreihe einen vollständigen Umsetzungsverlauf unter praxisgerechten Voraussetzungen und unter Berücksichtigung der gefundenen Ergebnisse zu untersuchen.

III. Verwertung der Optimierungsergebnisse unter praxisgerechten Voraussetzungen

1. Versuchsbedingungen

Folgende Kriterien wurden berücksichtigt:
Verwendung von Nährstoffen ohne definierte und gleichbleibende Zusammensetzung (Medium 3 mit Maisquellwasser), Erzeugung hoher Keimzahlen durch Zusatz von Hefeextrakt, kurze Anzuchtphase durch Beimpfung mit 10 % Inoculum, Substratzugabe gegen Ende des logarithmischen Wachstums nach Durchlaufen der Phase des höchsten Sauerstoffverbrauchs, hohe Substratbelastung unter Berücksichtigung des Problems, daß entsprechend hohe Lösungsmittelmengen toxisch wirken, Anzucht und Umwandlung bei einer mittleren Temperatur von 34° C, definierte Laufzeiten und vollständige Umwandlung des Einsatzmaterials, das in diesem Fall aus einem Gemisch von Hydrocortison (F) und Hydrocortison-17-Acetat (MAF) im Verhältnis 1 : 4 bestand.

2. Umwandlung eines Gemisches von Hydrocortison und Hydrocortison-17-Acetat zu Prednisolon

Verglichen wurde die Umwandlung von 0,5, 0,75 und 1 g Einsatzmaterial pro Liter bei Hefeextraktkonzentrationen von 0,1, 0,5 und 1 %. Analytisch verfolgt und in Abbildung 34 graphisch dargestellt wurde das Verschwinden von Hydrocortison in der letzten Fermentationsphase. Der Verseifungsschritt MAF zu F trat nicht mehr in Erscheinung, da er zügig zu Fermentationsbeginn ablief. Die Abbildung zeigt, daß bei Zusatz von 0,1 % Hefeextrakt nur 0,5 g/l nicht aber 0,75 und 1 g MAF-F/l vollständig umgewandelt wurden. Schon bei Zusatz von 0,5 % Hefeextrakt ließen sich 0,75 und 1 g MAF-F/l

ohne Verlängerung der Laufzeit vollständig umsetzen. Steigerungen sind sicher möglich.

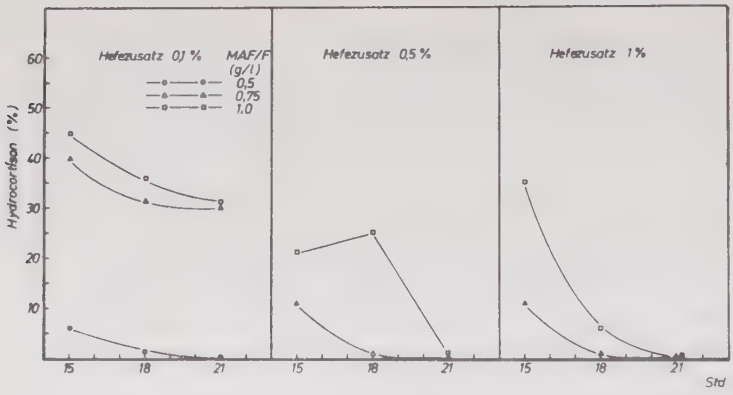


Abb. 34 Umwandlung von MAF-F zu Prednisolon bei Einsatzmengen zwischen 0,5 und 1 g/l und Hefezusatz zwischen 0,1 und 1 %

500 ml Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Füllung FP-Medium (0,1; 0,5; 1,0 % Hefeextrakt) wurden mit 10 % Inoculum beimpft, zur 5. Stunde 0,5; 0,75 und 1,0 g MAF-F/l zugesetzt und der Umsetzungsverlauf in den letzten 6 Stunden der Fermentation dünnschichtchromatographisch verfolgt.

In einer zweiten Versuchsserie wurde ermittelt, wie sich bei Zusatz von 0,5 % Hefeextrakt die Laufzeiten bei weiterer Steigerung der Einsatzmengen verlängern, ohne daß ein Rest zurückbleibt. Es ergab sich eine Grenze der Belastbarkeit, die bei 1,5 g MAF-F/l lag (Abb. 35).

Durch Steigerung der Bakteriendichte ist auch hier eine weitere Erhöhung der Belastbarkeit mit Substrat zu erwarten.

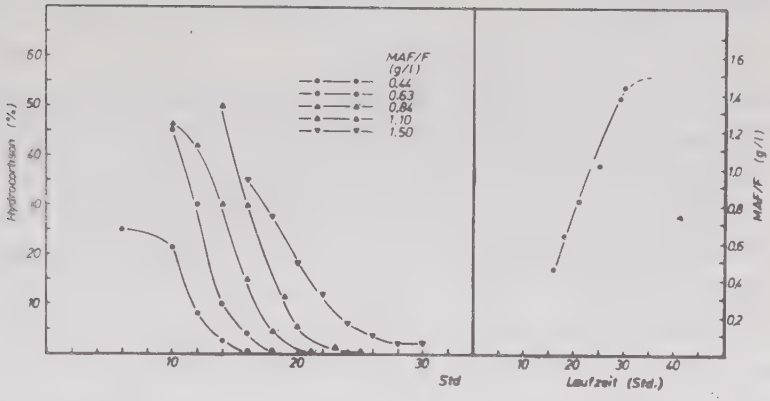


Abb. 35 Verlängerung der Laufzeit bei Steigerung der Einsatzmenge an MAF-F

Nach Vorbereitung der Versuche wie in Abb. 34 wurden unterschiedliche Substratkonzentrationen zwischen 0,44 g/l und 1,5 g MAF-F/l zugesetzt und dünnschichtchromatographisch der Einfluß auf die Laufzeit untersucht.

Wenn man in den Grenzbereich der Belastbarkeit kommt, ist es in jedem Falle zweckmäßig, insbesondere die Nährstoffkonzentration und damit die Zelldichte, die Belüftung, die Substratbelastung mit der dazu erforderlichen Lösungsmittelmenge, die Laufzeit und eventuell die Erfordernisse einer Extraktion des Endproduktes aufeinander abzustimmen und die anderen Parameter wie beschrieben optimal zu halten.

DISKUSSION

Nach den ersten Veröffentlichungen einer erfolgreichen mikrobiologischen Transformation durch MAMOLI und VERCELLONE (1937) wurde eine Vielzahl von Mikroorganismen bekannt, die in der Lage waren, die unterschiedlichsten Steroidsubstrate umzuwandeln. Neben Hydroxylierungen konnten zahlreiche Dehydrogenierungen, insbesondere Δ^1-Dehydrogenierungen, gefunden werden. Dabei zeigten in besonderem Maße Bakterien, aber auch einzelne Pilze, diese spezifische Aktivität. Aus der großen Zahl der Veröffentlichungen zur Δ^1-Dehydrogenierung seien die Arbeiten von LEVY und TALALEY (1959) mit Pseudomonas testosteroni, SIH und BENNETT (1960, 1962) mit Nocardia restrictus, GOODMAN et al. (1960) sowie IIDA et al. (1965) mit Bacillus cyclooxydans, CHARNEY et al. (1962), HERZOG et al. (1962), KONDO und MASUO (1961), KONDO (1963) sowie NOBILE et al. (1955) mit Corynebacterium simplex, MAXON und CHEN (1966), CHEN et al. (1962) sowie CHEN et al. (1965) mit Septomyxa affinis und HAYANO et al. (1961), RINGOLD et al. (1963), RINGOLD und TURNER (1962) sowie STOUDT et al. (1955) mit Bacillus sphaericus genannt.

Während sich die älteren Arbeiten mehr mit der Bekanntgabe neu aufgefundener aktiver Mikroorganismen und der Identifizierung der umgewandelten Metabolite beschäftigten, befaßten sich neuere Arbeiten mit der Aufklärung des Dehydrogenierungsmechanismus (JERUSSI und RINGOLD, 1965) und mit der Enzyminduktion und Enzymisolierung (PENASSE und PEYNE, 1968).

Die in diesem Bericht beschriebene Optimierung einer mikrobiologischen Δ^1-Dehydrogenierung von Hydrocortison zu Prednisolon mit Bacillus sphaericus ging davon aus, Kriterien der Anzucht des Organismus und Parameter der Steroidumwandlung abzustimmen und optimal zu gestalten.

Vielfach leiden die Reproduzierbarkeit der Versuche und die Transparenz der Ergebnisse darunter, daß bei der Fermentation viele Parameter gewollt oder ungewollt variabel sind, so daß sich mehrere Effekte überlagern können und die Interpretation erschweren. Eine angestrebte und an sich durchaus realistische Optimierung der Wachstumstemperatur kann durch eine ungewollte und unerkannte Verschlechterung der Nährstoffqualität unentdeckt bleiben. Oder eine Änderung der Belüftungsintensität bringt zwangsläufig eine Änderung der Effektivität der Durchmischung mit sich, von der man nicht weiß, wie sie sich z.B. auf die Verteilung von Steroid in der Fermentationslösung auswirkt. Dazu stellt sich die Frage, ob man vernachlässigen kann, daß eine variierte Belüftung evtl. den Bedarf an Antischaummittel verändert. Versuchsplanung und Versuchsdurchführung müssen diese Probleme berücksichtigen und möglichst viele dieser unerwünschten Nebeneffekte auszuschalten versuchen, die nur die Beurteilung der Resultate erschweren.

Da sich die Versuche über einen längeren Zeitraum erstreckten, war die Anzucht von einheitlichem mikrobiologischem Ausgangsmaterial die erste Frage von besonderem Interesse. Hier haben sich die nach dem unter Methoden beschriebenen Verfahren hergestellten Trockenchargen bewährt. Nach den gemachten Erfahrungen ist diese Methode insbesondere hinsichtlich der Sterilität und Aktivität der Dehydrogenasebildung den Verfahren der periodischen Überimpfungen weit überlegen. Aber auch gegenüber dem normalen Gefriertrocknungsverfahren, bei dem vor der eigentlichen Trocknung ein rasches Einfrieren bei tiefer Temperatur vorzunehmen ist, waren Vorteile für die Lagerfähigkeit erkennbar; die Zahl der überlebenden Zellen blieb bis zum Ende des Versuchszeitraums gleichmäßig hoch.

Von gleicher Bedeutung und vor Versuchsbeginn zu klären war die Frage nach den einzusetzenden Nährstoffen. Die Bestandteile synthetischer Medien mit ihren überwiegend definierten und reproduzierbaren Qualitäten waren dabei am wenigsten problematisch. Aber wenn Caseinhydrolysat und

Vitamine Einfluß auf Wachstumsgeschwindigkeit und Ertrag ausüben, ist höchste Reinheit der Geräte, höchste Genauigkeit der Einwaage und gleichmäßiges Vorbereiten, insbesondere Sterilisieren, erforderlich. Für die Versuche in Vollmedien, also FP-Medium mit Zusätzen unterschiedlicher Mengen Hefeextrakt, wurden Produkte der Firma OXOID verwendet, die gleichbleibende, gute Qualität garantieren. Wenn es trotzdem nicht gelungen ist, bei gleichen Versuchsbedingungen stets gleich hohe Zellerträge zu erhalten, so mag das wohl als Summe der unvermeidlichen kleineren Schwankungen über den gesamten Versuchsverlauf zu erklären sein. Alle Versuchsergebnisse sind schon deshalb auf eine einheitliche Zellmasse zu beziehen. Die Versuche im letzten Teil der Arbeit wurden mit Maisquellwasser und Hefeextrakt handelsüblicher Qualität durchgeführt.

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit synthetischen Medien bedürfen der Erörterung. Aufbauend auf die für verschiedene Bacillaceae von KNIGHT und PROOM (1950) sowie PROOM und KNIGHT (1953) beschriebenen Zusammensetzungen wurden die ersten Ergebnisse ermittelt. Es stellte sich heraus, daß übliche Kohlenstoffquellen, wie einfache Zucker, nicht verwertet werden konnten, desgleichen nicht Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle und Harnstoff nur bei Mangel an Eiweiß bzw. Aminosäuren. Neben den Mineralsalzen erwiesen sich als einzige und essentielle Komponenten Aminosäuren - in komplexer Form als Caseinhydrolysat angeboten - und Biotin. Sie bestimmten Wachstumsgeschwindigkeit und Ertragshöhe. Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit wurde für 30° C mit 0,85 (h^{-1}) ermittelt.

Für die Zusammensetzung des Vollmediums wurden folgende Ergebnisse nach den Wachstumsversuchen mit synthetischem Medium verwertet: Als Bestandteile wurden Fleischextrakt, Pepton und Hefeextrakt ausgewählt, die beiden ersten Komponenten in erster Linie als Lieferanten für Aminosäuren, Hefeextrakt insbesondere auch als Lieferant für Vitamine. Bei der Planung der weiteren Versuche wurde darauf Wert gelegt, die Phase der Anzucht und

die Phase der Dehydrogenierung möglichst zeitlich zu trennen, um sie getrennt untersuchen zu können und so zu klaren Ergebnissen zu kommen. Wie sich dann zeigte, kamen die Eigenschaften des Organismus diesem Wunsch sogar entgegen, da die höchste Dehydrogenaseaktivität erst gegen Ende der logarithmischen Phase einsetzte. Ein solches Verhalten legt es nahe, diesen Fermentationsverlauf nach GADEN (1955, 1959) dem Fermentationstyp III zuzuordnen, bei dem Wachstum mit Substratverbrauch und Produktbildung nacheinander und voneinander getrennt ablaufen. Einen ähnlichen Verlauf fanden MAXON und CHEN (1966) bei einer Δ^1-Dehydrogenierung mit Septomyxa affinis.

Die Anzuchtphase war also nicht unter dem Gesichtspunkt der Steroidumwandlung zu sehen; sie hatte zum Ziel, bei für die Wachstumsgeschwindigkeit optimaler Temperatur (38° C) möglichst hohe Zelldichten zu erreichen. Die Funktion, die Zelldichte zu steigern, die im synthetischen Medium das Caseinhydrolysat und die Vitamine hatten, kam im Vollmedium dem Fleischextrakt und dem Pepton sowie dem Hefeextrakt zu. Mit Steigerung dieser Komponenten ließ sich ohne Mühe bis 3 g Trockenmasse/l erzeugen.

Nun wurde aber mit steigenden Zelldichten der Einfluß der Belüftung immer wichtiger, mußte man doch befürchten, daß der Sauerstoff zum wachstumsbegrenzenden Faktor wurde. Um hier zu Hinweisen zu gelangen, wurde ein Verfahren entwickelt, das es erlaubte, die für die Wachstumsgeschwindigkeit kritische Sauerstoffkonzentration zu ermitteln, ohne dabei die Belüftung so stark reduzieren zu müssen, daß eine Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit zu erkennen ist. Die Begasung mit N_2/O_2-Gasgemischen von unterschiedlichem Sauerstoffgehalt hatte dabei den Vorteil, daß das Sauerstoffangebot variiert werden konnte, ohne die durchströmende Gasmenge ändern zu müssen. Die Durchmischungsintensität blieb konstant. Da die Sauerstoffwerte nach der polarographischen Methode gemessen wurden, werden sie in mm Hg angegeben. Für die Angabe der Sauerstoffkonzentration in

mg/l wurden Eichkurven erstellt. Wenn in FP-Medium mit 2 % Hefeextrakt angezüchtet und dabei mit 16,6 % O_2 im Gasgemisch entsprechend einem $K_L a \cdot C_E$ von 25 mmolen O_2/l · h belüftet wurde, dann stellte sich in der logarithmischen Phase für eine gewisse Zeit ein Tiefstwert mit 20 mm Hg bzw. 0,2 bis 0,3 mg O_2/l ein, der die Wachstumsgeschwindigkeit hemmte. Bei dieser Versuchsdurchführung lag also die kritische Sauerstoffkonzentration unter 50 und über 20 mm Hg (unter 0,5 und über 0,2 mg O_2/l); dies wurde bei der Anzucht berücksichtigt. BROWN (1970) gibt für eine Reihe von Mikroorganismen kritische Sauerstoffwerte zwischen 0,26 und 2 mg O_2/l an. Hieraus ist ersichtlich, daß diese Werte individuell verschieden sein und in weitem Bereich schwanken können. Erwartungsgemäß nahm der Sauerstoffbedarf der Kultur in der stationären Phase stark ab, was aus manometrischen Messungen und Submersversuchen hervorging. Dabei war ein Punkt von besonderem Interesse, daß nämlich die aus der beginnenden stationären Phase geerntete, gewaschene und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommene Kultur nur einen kaum meßbaren Sauerstoffbedarf besaß. Stärkerer Sauerstoffbedarf hätte sich sonst sehr störend bei der Ermittlung der kritischen Sauerstoffkonzentration für die Δ^1-Dehydrogenierung ausgewirkt.

Für die Untersuchung der Dehydrogenierung von Hydrocortison zu Prednisolon wurden einige Vereinfachungen getroffen, um die Ergebnisse besser reproduzierbar und durchschaubar zu machen. Zunächst wurde, wenn möglich, der Versuchszeitraum auf drei Stunden zu Beginn der stationären Phase beschränkt. Hier verfügte die Kultur über optimale Dehydrogenierungsaktivität, und es war anzunehmen, daß sich der physiologische Zustand der Kultur in diesem Zeitraum nicht wesentlich ändern würde, worauf auch das fast konstante $K_L a$ hindeutete. Sodann wurden die Zellen von den restlichen Nährstoffen getrennt, um keinen Sauerstoff zur Veratmung dieser Nährstoffe anbieten zu müssen. Als Versuchstemperatur wurde 30° C, als Durchflußmenge 20 l/l · h festgelegt. Als Zellkonzentration in der Kochsalzlösung

wurden stets 2 g/l angestrebt und auch stets ungefähr erreicht. Die Substratbelastung wurde mit 180 mg/l so gewählt, daß sich aus den innerhalb von drei Stunden gemessenen Werten die Umsatzrate ermitteln ließ.

So vorbereitet, konnten ohne große methodische Schwierigkeiten klare Ergebnisse erzielt werden. Dabei stellte sich jeweils eine optimale Rate der Prednisolonbildung von 30 mg/h · gTG ein.

Es wurde deutlich, daß die Befähigung zur Dehydrogenierung an die Anwesenheit der Zellen gebunden war und daß die Produktbildungsgeschwindigkeit mit der Zellkonzentration linear anstieg. Weiter ergab sich, daß die Dehydrogenierungsaktivität der Zellen nach Zerstörung in einer Zellmühle in voller Höhe erhalten blieb. Das pH-Optimum lag zwischen 7 und 9 und bedurfte keiner Korrektur. Der optimale Temperaturbereich wurde mit 30 bis 35° C ermittelt und wich vom Temperaturoptimum des Wachstums ab (38° C). Hier bietet sich der Kompromiß an, für Anzucht und Steroidtransformation bei einer mittleren Temperatur von 34° C zu arbeiten.

Der für die Dehydrogenierung kritische Sauerstoffbereich lag nun doch nicht so niedrig, wie man nach den Literaturhinweisen (LEVY und TALALEY, 1959) hätte vermuten können; 50 mm Hg bzw. 2,2 mg O_2/l werden als recht hoch angesehen, zumal ein direkter Verbrauch mit der polarographischen Elektrode gar nicht festzustellen war. Dieser Wert dürfte aber trotzdem keine Probleme aufwerfen, da die wesentlichen Phasen der Dehydrogenierung nicht während der logarithmischen Wachstumsphase, dem Zeitraum höchsten Sauerstoffbedarfs also, ablaufen sollten, sondern daran anschliessend, wenn sich in der Suspension nach Rückgang der Atmungsintensität ein Sauerstoffgehalt nahe dem Sättigungswert eingestellt hatte. Diese Versuchsergebnisse wurden wieder durch Belüftung mit den schon genannten Gasgemischen erzielt. Mit ihrer Hilfe war es möglich, einen Zustand zu simulieren, der man sonst nur herbeiführen konnte, indem man durch Zusatz toxischer

Nährstoffe durch Atmung intensiven Sauerstoffverbrauch auslöst, oder den man herbeiführen müßte, indem man den Luftdurchsatz extrem reduziert. Letzteres sollte wegen der Änderung der Durchmischungsintensität auch vermieden werden. Immer hätte sich das Problem ergeben, welcher Ursache man die Ergebnisse hätte zuordnen sollen.

Die abschließenden kompletten Umsetzungsversuche zeigten, daß die quasi im Ausschnitt über einen begrenzten Versuchszeitraum ermittelten Ergebnisse auch auf den normalen vollständigen Umwandlungsverlauf zu übertragen sind. Durch Optimierung der Nährstoffe und damit Erzeugung höherer Zellmassen ließ sich auch hier der Substrateinsatz steigern. Zusätzliche Steigerungsmöglichkeiten ergaben sich durch eine Verlängerung der Fermentationszeit.

Wo die Grenzen liegen und wie die einzelnen Parameter aufeinander abgestimmt werden müssen, ist von Fall zu Fall neu zu überdenken, dies hängt nicht zuletzt von den apparativen Möglichkeiten der Fermentation und eventuell der Extraktion des Endproduktes ab.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Testorganismus wurde nach den in BERGEY'S MANUAL (1957) niedergelegten systematischen Kriterien als Bacillus sphaericus var. fusiformis identifiziert. Auf Grund der trommelschlegelartigen Zellgestalt wurde der Organismus der morphologischen Gruppe III zugeordnet. Die Versuche zur Hydrolyse von Stärke, Casein und Lecithin verliefen negativ; Abbau von Gelatine und Harnstoff konnten festgestellt werden. Zur Säurebildung aus den Kohlenhydraten Glucose, Lactose, Maltose, Mannit und Salizin war der Organismus nicht in der Lage. Die Prüfung auf Voges-Proskauer-Reaktion, Nitratreduktion, Citratvergärung, Wachstum auf Glucose-Nitrat-Agar und anaerobes Wachstum in Glucose verlief negativ. Wachstum bei Zusatz von NaCl wurde bis 8 % nachgewiesen. Die optimale Wachstumstemperatur lag bei 38° C, bei Temperaturen über 45° C konnte keine Vermehrung mehr festgestellt werden. Bei pH-Werten zwischen 6 und 7 zeigten sich keine Wachstumsunterschiede; Zusätze von Biotin und Thiamin waren erforderlich. Indolbildung aus Tryptophan wurde nicht festgestellt. Dehydrogenaseaktivität, speziell die Δ^1-Dehydrogenierung von Hydrocortison unter Bildung von Prednisolon, ließ sich nachweisen.

2. In Wachstumsversuchen wurde ein synthetisches Minimalmedium entwickelt, dessen essentielle Komponenten Mineralsalze, Caseinhydrolysat und Vitamine waren. Dabei zeigte sich, daß die Caseinhydrolysatkonzentration sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit als auch den Ertrag beeinflußte. Für 0,2 % Caseinhydrolysat betrug die Wachstumsrate $\mu = 0,82$ (Std.$^{-1}$) und der Ertrag 495 mg TG/l. Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm ergab sich für Caseinhydrolysat eine maximale Wachstumsrate μ_{max} von 0,85 (Std.$^{-1}$) und die Michaeliskonstante als Konzentration für die halbmaximale Geschwindigkeit zu 0,0104 %.

Als Kohlenstoffquellen wurden die Zucker Glucose, Lactose, Maltose, Arabinose, Ribose und Xylose in Konzentrationen zwischen 0,2 und 2 % bei verschiedenen Caseinhydrolysatkonzentrationen sowie die Zucker Fructose und Saccharose untersucht. Ein Verbrauch einer dieser Kohlenstoffquellen war weder analytisch noch indirekt durch Änderung von Wachstumsgeschwindigkeit oder Ertrag zu erkennen.

Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle ließ sich nicht verwerten, Harnstoff nur bei Mangel an Aminosäuren. Bei ausreichendem Angebot an Aminosäuren in Form von Caseinhydrolysat wurde kein Harnstoff abgebaut.

Biotin (4 µg/l) erwies sich als essentiell für das Wachstum; höhere Konzentrationen steigerten den Ertrag. Die fünffache Menge Biotin (20 µg/l) verdreifachte den Ertrag auf etwa 1,5 g TG/l. Zusatz von Thiamin allein ermöglichte kein Wachstum.

In synthetischem Minimalmedium ließ sich eine mikrobielle Dehydrogenierung von Hydrocortison zu Prednisolon nachweisen. Bei einem Trockengewicht von 500 mg/l waren nach 48 Stunden etwa 50 % des Einsatzmaterial umgewandelt.

3. Als grundlegendes Vollmedium gelangte FP-Medium unter Zusatz von 0,1 % Hefeextrakt zum Einsatz. Hierfür lauteten die Wachstumsparameter: Wachstumsrate 0,78 (Std.$^{-1}$), Verdopplungszeit 53 (Min.) und Ertrag 720 mg TG/l. Zur Steigerung des Ertrages wurden diesem Grundmedium nacheinander je 0,5 % Caseinhydrolysat, Hefeextrakt, Pepton, Gelatine und Sojamehl zugesetzt. Caseinhydrolysat und Hefeextrakt erbrachten die höchsten Erträge. Bei Zusatz von 1,5 % Hefeextrakt wurde ein Zellmasseertrag von 3 gTG/l erreicht.

In den Versuchskolben wurden die Sauerstoffübergangskoeffizienten nach der Sulfitmethode ermittelt. Für Schüttelkolben ergab sich unter Versuchsbedingungen ein $K_L a \cdot C_E$ von 12 und für Belüftungskolben von 30,5 mmolen $O_2/l \cdot h$.

Der Sauerstoffgehalt der Kulturlösungen und der Verbrauch des Organismus während der Wachstumsphase wurden mit einer Sauerstoffelektrode nach dem polarographischen Prinzip gemessen. In Eichkurven wurden die Zusammenhänge zwischen den so gemessenen Partialdrücken und den gelösten Sauerstoffmengen in mg/l für verschiedene Medien dargestellt. Bei 30° C lagen die Sättigungswerte (160 mm Hg) für Wasser bei 7,6 mg O_2/l und für FP-Medium mit Hefezusatz, dem am stärksten konzentrierten Medium, bei 2,0 mg O_2/l. Für physiologische Kochsalzlösung ergab sich ein Sättigungswert von 7,1 mg O_2/l, Zusatz von 2 % Hefeextrakt erniedrigte den Wert auf 5,0 mg O_2/l und Medium 3 (Maisquellwasser 0,5 %, Hefeextrakt 0,1 %) wies bei 6,0 mg O_2/l Sättigung auf.

Der für die Anzucht kritische Sauerstoffpartialdruck lag bei 4[illegible] mm Hg ([illegible],3 mg O_2/l). Wurde diese Konzentration für längere Zeit unterschritten (z.B. 3 Stunden bei 20 - 30 mm Hg), so verlangsamte sich die Wachstumsgeschwindigkeit bei Erreichen einer Zellkonzentration von etwa 1 g TG/l beträchtlich. Weiter erniedrigtes Sauerstoffangebot behinderte das Wachstum noch intensiver.

Nach manometrischen Messungen lag der Sauerstoffverbrauch nach Ernte aus der beginnenden stationären Phase (10. Std.) und Aufnehmen in physiologischer Kochsalzlösung mit 43 µg/h · g TG sehr niedrig. Zusatz frischer FP-Lösung und Hefeextrakt erhöhte den Verbrauch auf 210 mg Sauerstoff/h · g TG. Zusatz von Caseinhydrolysat steigerte den Verbrauch auf 140 mg/h · g TG.

In den ersten drei Stunden der stationären Phase wurde in der weitgehend

von Nährstoffresten befreiten und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommenen Zellsuspension ein durchschnittlicher Sauerstoffverbrauch von etwa 7,5 mg O_2/h · g TG gemessen. In diesem Zeitraum sank der nach der dynamischen Methode ermittelte K_La-Wert nur geringfügig von 2,27 auf 2,18 (min^{-1}).

4. Die in diesen ersten drei Stunden der stationären Phase ermittelte optimale Rate der Prednisolonbildung war 30 mg Prednisolon/h · g TG. Der für die Substratzugabe am besten geeignete Zeitpunkt lag am Ende der logarithmischen Phase etwa zur 10. Stunde. Als optimaler pH-Bereich erwies sich der Bereich zwischen 7 und 9. Bei pH 6 reduzierte sich die Rate der Produktbildung von 30 auf 15, bei pH 10 auf 17,5 mg/h · g TG. Der optimale Temperaturbereich mit einer Rate von 30 mg Prednisolon/h · g TG wurde zwischen 30 und 35° C gefunden. Für 25° C lag die Rate bei 10, für 40° C bei 25 und für 45° C nahe 0 mg Prednisolon/h · g TG. Als der für die Prednisolonbildung kritische Sauerstoffgehalt der Fermentationslösung konnten die Werte 50 mm Hg entsprechend 2,2 mg O_2/l ermittelt werden. Oberhalb dieser Konzentration änderte sich die Höchstgeschwindigkeit bis zur Sättigung (160 mm Hg, 7,1 mg O_2/l) nicht mehr. Unterhalb 50 mm Hg verlangsamte sich die Prednisolonbildung; sie lag für 8 mm Hg (0,4 mg O_2/l) bei 20 mg Prednisolon/h · g TG und bei Partialdrücken nahe Null im Meßzeitraum bei etwa 4 mg Prednisolon/h · g TG.

Die Dehydrogenierungsaktivität konnte durch Steigerung der Zelldichte linear gesteigert werden. Die Versuche wurden bis 3,8 g TG/l - entsprechend einer Prednisolonbildungsgeschwindigkeit von 115 mg/h - ausgedehnt.

Bei Variieren der Einsatzmenge an Hydrocortison stellte sich Enzymsättigung bei 150 mg/l ein. Bei dieser Konzentration wurde die höchste Rate der Bildung von Prednisolon mit 30 mg/h · g TG erreicht und bis zu einer Sub-

stratkonzentration von 2 g/l gehalten. Bei 3 g Hydrocortison/l betrug die Rate noch 15 mg Prednisolon/h · g TG.

Ein vollständiger Umsetzungsverlauf bei verschiedenen Konzentrationen eines Gemisches von Hydrocortison und Hydrocortison-17-Acetat wurde in Abhängigkeit von der Hefeextraktkonzentration verfolgt. Bei Zugabe von 0,5 % Hefeextrakt zum Grundmedium konnte die Substratbelastung von 0,5 auf 1 g Hydrocortison/l gesteigert werden, ohne daß sich die Laufzeit verlängerte. In diesem Medium lag die Grenze der Belastbarkeit bei 1,5 g Hydrocortison/l; dabei verlängerte sich die Laufzeit um etwa 10 Stunden. Mit noch höheren Einsatzmengen war keine vollständige Umwandlung mehr möglich.

LITERATURVERZEICHNIS

BARTHOLOMEW, J. W. MITTWER, T.	1950	A simplified bacterial spore stain Stain Techn. 25, 153.
BELL, G. H. GALLO, M.	1971	Effect of impurities on oxygen transfer. Proc. Biochem. 33 - 35.
BERGEY'S MANUAL	1957	7th Edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
BRONN, W. K.	1967	Sauerstoffbedarf aerober Mikroorganismen und Technik der Sauerstoffversorgung. Zbl. Bakt. I. Suppl. 2, 45 - 64.
BROWN, D. E.	1970	Aeration in the submerged culture of microorganisms. Meth. Microbiol. 2, 125 - 174.
CAPEK, A. HANC, O. MALIKOVA, E.	1957	Bacterial conversion of steroids. VIII. The effect of progesterone on the course of the principal fermentative curves in the strain Rhizopus nigricans. Ceskoslov. microbiol. 2, 282 - 285.
CAPEK, A. HANC, O. TADRA, M.	1966	Microbial transformations of steroids. Academia Publishing House of the Czechoslovak Academy of Science.
CEJKA, A.	1970	Sauerstoffversorgung bei der Umsetzung von Steroiden, dargestellt am Beispiel der Dehydrierung von Hydrocortison zu Prednisolon. 2. Symposium Technische Mikrobiologie, Berlin, Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, Herausg. H. Dellweg, 205 - 212.
CEJKA, A.	1972	Persönliche Mitteilung.

CHARNEY, W.
NOBILE, A.
FEDERBUSH, C.
SUTTER, D.
PERLMAN, P.L.
HERZOG, H.L.
PAYNE, C.C.
TULLY, M.E.
JEVNIK-GENTLES, M.
HERSHBERG, E.B.
1962
The action of Corynebacterium simplex on non-corticoid steroid substrates. Tetrahedron 18, 591 - 596.

CHARNEY, W.
HERZOG, H.L.
1967
Microbial transformations of steroids. Academic Press, New York and London.

CHEN, J.W.
HILLS, F.J.
KOEPSELL, H.J.
MAXON, W.D.
1965
1-Dehydrogenation of steroids at levels above their solubilities. Ind. Engng. Process. 4, (4), 421 - 425.

CHEN, J.W.
KOEPSELL, H.J.
MAXON, W.D.
1962
Kinetics of 1-dehydrogenation of steroids by Septomyxa affinis. Biotechnol. Bioeng. 4, 65 - 78.

CLAUS, D.
1965
Anreicherungen und Direktisolierungen aerober sporenbildender Bakterien. Zbl. Bakt. I. Suppl. 1, 337 - 362.

COLINGSWORTH, D.R.
BRUNNER, M.P.
HAINES, W.J.
1952
11ß-Hydroxylation by Streptomyces fradiae. J. Am. Chem. Soc. 74, 2381 - 2382.

COOPER, C.M.
FERNSTRÖM, G.A.
MILLER, S.A.
1944
Performance of agitated gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem. 36, 504 - 509.

CORMAN, J.
TSUCHIYA, H.M.
KOEPSELL, H.J.
BENEDICT, R.G.
KELLEY, S.E.
FEGER, V.H.
DWORSCHACK, R.G.
JACKSON, R.W.
1957
Oxygen absorption rates in laboratory and pilot plant equipment. Appl. Microbiol. 5, 313 - 318.

FRIED, J.
THOMA, R. W.
KLINGSBERG, A. 1953 Side-chain degradation, ring D cleavage and dehydrogenation in ring A. J. Am. Chem. Soc. 75, 5764 - 5765.

FRITSCHE, W. 1967 Bedeutung der Biochemie für mikrobielle Produktionsprozesse. Biol. Rdsch. 6, (4), 145 - 159.

GADEN, E. L. jr. 1955 Fermentation kinetics and productivity. Chemistry and Industry (Rev.), 154 - 159.

GADEN, E. L. jr. 1959 Fermentation process kinetics. J. Biochem. Mikrobiol. Techn. Engng. 1, 4, 413 - 429.

GALE, P. H.
PAGE, A. C. jr.
STOUDT, T. H.
FOCKERS, K. 1962 Identification of vitamin $K_{2(35)}$ an apparent cofactor of a steroidal 1-dehydrogenase of Bacillus sphaericus. Biochemistry 1, 788 - 792.

GIBSON, T. 1935 The urea-decomposing microflora of soils. I. Description and classification of the organisms. Zbl. Bakt. II, 92, 364 - 380.

GOODMAN, J. J.
MAY, M.
SMITH, L. L. 1960 16-αhydroxy steroids. J. Biol. Chem. 235, 965 - 971.

HARTMAN, R. E.
HOLMLUND, C. E. 1962 Binding of steroids by microorganisms. J. Bact. 84, 1254 - 1259.

HAYANO, M.
RINGOLD, H. J.
STEFANOVIC, V.
GUT, M.
DORFMAN, R. I. 1961 The stereochemical course of enzymatic steroid 1,2-dehydrogenation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, (6), 454 - 459.

HENCH, P. S.
KENDALL, E. C.
SLOCUMB, C. H.
POLLEY, H. F. 1950 A. M. A. Arch. Internal Med. 85, 545.

HERZOG, H.L.
NOBILE, S.
TOLKSDORF, W.
CHARNEY, E.B.
HERSHBERG, P.L.
PERLMAN, P.L.
PECHET, M.M.
1955
New antiarthritic steroids.
Science 121, 176.

HERZOG, H.L.
PAYNE, C.C.
HUGHES, M.T.
GENTLES, M.J.
HERSHBERG, E.B.
NOBILE, A.
CHARNEY, W.
FEDERBUSH, C.
SUTTER, D.
PERLMAN, P.L.
1962
Microbiological transformation of steroids - X
1-dehydro analogs of cortial steroids.
Tetrahedron 18, 581 - 589.

HORVATH, J.
KRAMLI, A.
1947
Microbiological oxidation of cholesterol with azotobacter.
Nature 160, 639.

IIDA, M.
TOWNSLEY, J.D.
HAYANO, M.
BRODIE, H.J.
1965
Preparation and properties of a cell-free enzyme system possessing both steroid hydrogenase and dehydrogenase activities.
Steroids, Suppl. I, 159 - 172.

IIZUKA, H.
NAITO, A.
1967
Microbial transformations of steroids and alkaloids.
University of Tokyo Press and University-Park Press, Pennsylvania.

JERUSSI, R.
RINGOLD, H.J.
1965
The mechanism of the bacterial C-1,2 dehydrogenation of steroids.
III. Kinetics and isotope effects.
Biochemistry 4, (10), 2113 - 2126.

KNIGHT, B.C.J.G.
PROOM, H.
1950
A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus Bacillus.
J. gen. Microbiol. 4, 508 - 538.

KONDO, E.
1963
Agr. Biol. Chem. 27, 69.

KONDO, E.
MASUO, E.
1961
"Pseudo-crystallofermentation" of steroid: A new process for preparing prednisolone by a microorganism.
J. Gen. Appl. Microbiol. 7, 113 - 117.

KRAMLI, A.
HORVATH, J.
1949
Microbiological oxidation of sterols.
Nature 163, 219.

KRAMLI, A.
HORVATH, J.
1948
Microbiological oxidation of sterols.
Nature 162, 619.

KUNDRAT, W.
1963
Zur Differenzierung aerober Sporenbildner (Genus Bacillus Cohn).
Zbl. für Veterinärmedizin Reihe B 10, (5), 418 - 426.

LEVY, H.R.
TALALAY, P.
1959
Bacterial oxydation of steroids.
I. Ring A dehydrogenations by intact cells.
J. Biol. Chem. 234, 2009 - 2014.

MAMOLI, L.
1939
Über biochemische Dehydrierungen in der Cortingruppe.
Ber. d. Deutschen Chem. Ges. 72, 1863 - 1865.

MAMOLI, L.
KOCH, R.
TESCHEN, H.
1939
Über die biochemische Dehydrierung von Keimdrüsenhormonen mit einem reinen Bakterienstamm.
Naturwiss. 27, 319.

MAMOLI, L.
VERCELLONE, A.
1937
Biochemische Umwandlung von Δ^4-Androstendion in Δ^4-Testosteron. Ein Beitrag zur Genese des Keimdrüsenhormons. Vorläufige Mitteilung.
Ber. d. Deutschen Chem. Ges. 70, 470 - 471.

MAMOLI, L.
VERCELLONE, A.
1937
Biochemische Umwandlung von Δ^5-Androstendion in Isoandrostandiol und Δ^4-Testosteron. Weiterer Beitrag zur Genese der Keimdrüsenhormone.
Ber. d. Deutschen Chem. Ges. 70, 2079 - 2082.

MAXON, W.D.
CHEN, J.W.
1966
Kinetics of fermentation product formation.
J. Ferm. Technol. 44, 255 - 263.

Mertz, H.	1967	Bedeutung und Anwendung mikrobiologischer Stoffumwandlungen. Zbl. Bakt. I. Suppl. 2, 24 - 38.
MÜLLER, J. MELCHINGER, H.	1964	Methoden der Mikrobiologie. Kosmos Verlag, Stuttgart.
NOBILE, A. CHARNEY, W. PERLMAN, P.L. HERZOG, H.L. PAYNE, C.C. TULLY, M.E. JEVNIK, M.A. HERSHBERG, E.B.	1955	Microbiological transformation of steroids. 1. $\Delta^{1,4}$-diene-3-ketosteroids. J. Am. Chem. Soc. 77, 4184.
NEHER, R.	1964	Steroid Chromatography, sec. Ed., 87 ff. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York.
OLIVAR, E.	1967	Der Einfluß von Dimethylsulfoxyd (DMSO) auf die Lagerfähigkeit von Pilzkulturen. Zbl. Bakt. I. Abtlg., Suppl. 2, 222 - 225.
PENASSE, L. PEYNE, M.	1968	Studies of 3-oxo steroid Δ^{1}-oxydo reductase of Arthrobacter simplex. Steroids 12, 525 - 544.
PETERSON, D.H. MURRAY, H.C.	1952	Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. J. Am. Chem. Soc. 74, 1871 - 1872.
PROOM, H. KNIGHT, B.C.J.G.	1953	The minimal nutritional requirements of some species in the genus Bacillus. J. gen. Microbiol. 13, 474 - 480.
RAUEN, H.M. (Hrsg.)	1964	Biochemisches Taschenbuch, 2. Teil, 2. Aufl., Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, S. 890.
RINGOLD, H.J. TURNER, A.	1962	Kinetic and thermodynamic control of quinone dehydrogenations. Chem. Ind. 211 - 213.

RINGOLD, H. J.
HAYANO, M.
STEFANOVIC, V.
1963
Concerning the stereochemistry and mechanism of the bacterial C-1, 2 dehydrogenation of steroids.
J. Biol. Chem. 238, (6), 1960 - 1965.

SIH, C. J.
BENNETT, R. E.
1960
Enzymatic dehydrogenation of steroid A ring.
Biochim. Biophys. Acta 38, 378 - 379.

SIH, C. J.
BENNETT, R. E.
1962
Steroid 1-dehydrogenase of Nocardia restrictus.
Biochim. Biophys. Acta 56, 584 - 592.

SCHLEGEL, H. G.
1969
Allgemeine Mikrobiologie.
G. Thieme Verlag, Stuttgart.

SMITH, N. R.
GORDON, R. E.
CLARK, F. E.
1952
Aerobic sporeforming bacteria.
Agriculture Monograph No. 16, United States Department of Agriculture.

STAHL, E.
1967
Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

STOUDT, T. H.
McALEER, W. J.
CHEMERDA, J. M.
KOZLOWSKI, M. A.
HIRSCHMANN, R. F.
MARLATT, V.
MILLER, R.
1955
The microbial 1-dehydrogenation of some Δ^4-3-Ketosteroids.
Arch. Bioch. Biophys. 59, 304 - 305.

TAGUCHI, H.
HUMPHREY, A. E.
1966
Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems.
J. of Ferm. 44, (12), 881 - 889.

TOLKSDORF, S.
BATTIN, M. L.
CASSIDY, J. W.
McLEOD, R. M.
WARREN, F. H.
PERLMAN, P. L.
1956
Adrenocortical properties of $\Delta^{1,4}$-pregnadiene-17α, 21-diol-3, 11, 20-trione (Meticorten) and $\Delta^{1,4}$-pregnadiene-11ß, 17α, 21-triol-3, 20-dione (Merticortelone).
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 92, 207 - 214.

VISCHER, E.
WETTSTEIN, A. 1953 Mikrobiologische Reaktionen. Seitenketten-Abbau und Dehydrierung bei Steroiden. Experientia 9, 371 - 372.

VISCHER, E.
MEYSTRE, CH.
WETTSTEIN, A. 1955 Mikrobiologische Herstellung von 1-Dehydro-Steroiden. Helv. Chim. Acta 38, 835 - 840.

VISCHER, E.
MEYSTRE, CH.
WETTSTEIN, A. 1955 Mikrobiologische Herstellung von 1-Dehydro-Steroiden. Helv. Chim. Acta 38, 1502.

WETTSTEIN, A. 1955 Conversion of steroids by microorganisms. Experientia 11, 465 - 504.

WINKLER, L. W. 1914 Über die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffs. Z. Anal. Chem. 53, 665 - 672.

LEBENSLAUF

Am 14. September 1936 wurde ich, Manfred Rippe, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Heinrich Rippe und seiner Ehefrau Bertha, geb. Dahlweg, in Bremen geboren. Nach der Übersiedlung meiner Eltern nach Achim Kreis Verden besuchte ich dort von 1943 bis 1947 die Grundschule und anschließend das Gymnasium an der Hermann-Böse-Straße in Bremen. Hier legte ich 1955 die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1955 begann ich mit einem naturwissenschaftlichen Studium in den Fächern Biologie, Chemie, Physik an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel. Dieses Studium schloß ich 1966 mit der Diplom-Hauptprüfung für Biologie ab. Schon 1964 war ich in die Firma Schering AG Berlin/Bergkamen eingetreten, in der ich jetzt als Diplom-Biologe in einem mikrobiologischen Fermentationsbetrieb tätig bin.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H.G. Schlegel für seine freundliche Unterstützung dieser Arbeit danken. Ebenso danke ich Herrn Dr. K. Hamann, der die Anregung gab und im Rahmen der Firma Schering AG die Durchführung ermöglichte.